

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

IVA ANDRIJANIĆ

**VALIDACIJA METODE TEKUĆINSKE
KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE
DJELOTVORNOSTI ZA ODREĐIVANJE
RAZGRADNIH PRODUKATA RISPERIDONA**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

IVA ANDRIJANIĆ

**VALIDACIJA METODE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE
ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI ZA ODREĐIVANJE
RAZGRADNIH PRODUKATA RISPERIDONA**

DIPLOMSKI RAD

Predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskoga stupnja
magistra kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Analitike istraživanja i razvoja
Pliva, Prilaz b. Filipovića 25, Zagreb
pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić
i neposrednim vodstvom Andreje Vukoje, mag. chem. u sklopu
Sveučilišnog diplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić koja mi je svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogla prilikom izrade mog diplomskog rada.

Posebno hvala i mojoj neposrednoj voditeljici, Andreji Vukoji mag.chem. na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi, podršci, uloženom trudu i nesebičnoj pomoći tijekom rada u Plivi.

Hvala i svim mojim prijateljima, kolegama koji su bili uz mene i pomogli mi svojim znanjem i ohrabrivanjem. Svojim društvom uljepšali su mi protekle godine studiranja.

Najljepše hvala mom mužu Nikoli na ljubavi, podršci, savjetima i velikom strpljenju. Hvala što si vjerovao u mene i kada to sama nisam.

I na kraju, najveću zahvalu upućujem svojim roditeljima na ljubavi, žrtvi, odricanju, podršci i razumijevanju čime su mi omogućili lijep i lagodan studentski život. Ovaj rad posvećujem vama.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	v
ABSTRACT	vi
1. UVOD.....	1
1.1. Svrha i cilj rada	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Risperidon	2
2.2. Metode analize risperidona i njegovih razgradnih produkata	4
2.3. Identifikacija razgradnih produkata risperidona	7
2.4. Validacija	11
2.4.1. Specifičnost i selektivnost	12
2.4.2. Linearnost	12
2.4.3. Područje rada metode	13
2.4.4. Točnost	13
2.4.5. Preciznost	13
2.4.6. Granica detekcije i kvantifikacije	13
2.4.7. Robusnost	14
2.4.8. Stabilnost otopina uzorka i standarda.....	14
2.4.9. Potaknuta razgradnja	14
2.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....	17
2.5.1. Teorijska podloga	17
2.5.2. Razvoj tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti	19
2.6. Program DryLab	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Oprema i instrumenti	22
3.2. Kemikalije.....	22
3.3. Parametri analitičke metode.....	23
3.4. Priprema pokretnih faza i otapala	24

3.4.1.	Priprema vodene pokretne faze	24
3.4.2.	Priprema otapala.....	24
3.5.	Priprema uzoraka	24
3.5.1.	Priprema otopina standarda	24
3.5.2.	Priprema uzoraka za određivanje linearnosti	24
3.5.3.	Priprema uzoraka za određivanje točnosti.....	25
3.5.4.	Priprema uzoraka za određivanje granica detekcije i kvantifikacije	26
3.5.5.	Priprema uzoraka i standarda za određivanje stabilnosti otopine.....	26
3.5.6.	Priprema uzoraka za određivanje preciznosti (ponovljivost)	26
3.5.7.	Priprema uzoraka za određivanje preciznosti (intermedijska preciznost)	27
3.5.8.	Priprema uzoraka za studiju potaknute razgradnje.....	27
3.5.9.	Ispitivanje robusnosti / računalni program DryLab.....	29
3.5.10.	Priprema uzoraka za određivanje selektivnosti	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1.	Linearnost.....	30
4.2.	Točnost.....	33
4.3.	Osjetljivost – granica detekcije i granica kvantifikacije	36
4.4.	Stabilnost standarda i uzorka	37
4.5.	Preciznost (ponovljivost i intermedijska preciznost)	37
4.6.	Specifičnost / potaknuta razgradnja	39
4.7.	Područje rada metode.....	44
4.8.	Selektivnost.....	44
4.9.	Robusnost.....	46
5.	ZAKLJUČAK.....	49
6.	LITERATURA	52
	ŽIVOTOPIS	vii

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

VALIDACIJA METODE TEKUĆNSKE KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI ZA ODREĐIVANJE RAZGRADNIH PRODUKATA RISPERIDONA

IVA ANDRIJANIĆ

Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Risperidon pripada grupi atipičnih antipsihotika koji se koriste u liječenju šizofrenije, bipolarnog poremećaja i poremećaja ponašanja kao što je autizam. Stoga je od izuzetne važnosti znati kako se pripravak risperidona ponaša pri odgovarajućim uvjetima skladištenja, odnosno koji su njegovi razgradni produkti i u kojoj su mjeri prisutni. U ovom diplomskom radu validirana je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za određivanja razgradnih produkata risperidona. U radu su validirani sljedeći parametri: linearnost, točnost, preciznost, specifičnost, selektivnost i robusnost. Potvrđene granice kvantifikacije i detekcije odgovaraju osjetljivosti USP i Ep monografske metode, te je metoda prikladna za analizu onečišćenja i razgradnih produkata u risperidon aktivnoj supstanciji. Stabilitetno indikativne karakteristike metode potvrđene su provođenjem potpomognute razgradnje u kiselom, lužnatom i oksidirajućem mediju, te pod utjecajem svjetla i povišene temperature. Metodom je uspješno odijeljeno 9 poznatih onečišćenja risperidona.

(55+ VII stranica, 20 slika, 33 tablice, 46 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: risperidon, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, validacija

Mentor: Prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Nives Galić
Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 14. ožujka 2017.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

VALIDATION OF THE ULTRAHIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF RISPERIDON DEGRADATION PRODUCTS

IVA ANDRIJANIĆ

Division of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University
of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Risperidone belongs to the group of atypical antipsychotic drugs most commonly used in therapy of schizophrenia, bipolar disease and behavioral disorders such as autism. It is very important to examine the stability of risperidone in storage conditions, and determine its degradation products. In this diploma thesis the ultrahigh pressure liquid chromatographic (UHPLC) method for determination of risperidone degradation products has been validated. The method was validated in the terms of linearity, accuracy, precision, specificity, selectivity and robustness. Limit of quantitation and detection are in correlation with USP and Ep monographic method, and for that reason the method is appropriate for the analysis of impurities and degradation products in risperidone active substance. Stability indicating characteristics of the method were confirmed through force degradation study in acidic, basic and oxidizing media, as well as under elevated temperature and influence of light. Nine known impurities of risperidone were successfully separated by validated UHPLC method.

(55+ VII pages, 20 pictures, 33 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia.

Key words: risperidone, validation, ultrahigh pressure liquid chromatography

Mentor: Dr. Nives Galić, Prof.

Reviewers: Dr. Nives Galić, Prof.
Dr. sc. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.
Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assist. Prof.

Replacement: Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14th March 2017

1. UVOD

1.1. Svrha i cilj rada

Risperidon pripada grupi antipsihotika te se koristi za liječenje psihičkih oboljenja poput šizofrenije, autizma i bipolarnog poremećaja.

Da bi se odredila stabilnost farmaceutskih pripravaka risperidona potrebna je validirana kvantitativna analitička metoda određivanja razgradnih produkata risperidona. Kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) ima niz prednosti pred klasičnim metodama tekućinske kromatografije, te prema dostupnoj literaturi nije pronađen rad koji opisuje razvoj i validaciju UPLC metode koja razdvaja risperidon i devet poznatih onečišćenja definiranih prema USP (*eng. United States Pharmacopeia*) i Ph. Eur. (*eng. European Pharmacopoeia*) monografijama.

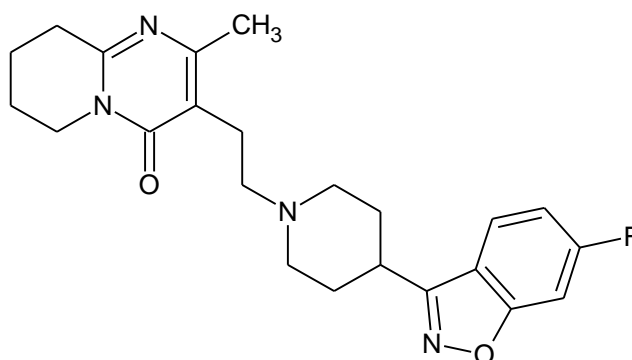
Cilj ovog rada je validirati metodu određivanja razgradnih produkata risperidona tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, odrediti njene stabilitetno indikativne karakteristike, te provesti studiju robusnosti metode pomoću računalnog programa DryLab, temeljenu na principima dizajna kvalitete. Metodu je razvila Andreja Vukoja, mag. chem. u okviru izrade svoje doktorske disertacije.

Validacijom metode potvrdit će se točnost, linearnost, osjetljivost (granica detekcije i kvantifikacije), robusnost i preciznost metode (ponovljivost i intermedijaska preciznost). Stabilitetno indikativne karakteristike metode ispitat će se prema preporukama Internacionalne konferencije za harmonizaciju (ICH). Određivanje stabilnosti u različitim uvjetima, kiselim, lužnatim, oksidirajućim, te pod utjecajem svjetla, služi kao potvrda prikladnosti metode za određivanje razgradnih spojeva.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Risperidon

Risperidon je derivat benzizoksala molekulske formule $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, koji se prema pravilima Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) naziva 3-[2-[4-[6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il]piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4*H*-pirido[1,2-*a*]pirimidin-4-on. Pripada grupi atipičnih antipsihotika koji se koriste u svrhu liječenja šizofrenije, bipolarnog poremećaja i poremećaja ponašanja kao što je autizam [1]. Risperidon je bijeli kristalinični prah s molarnom masom 410,49 g/mol i temperaturom taljenja 170 °C, a primjenjuje se oralno i intravenozno [2]. U većini slučajeva metaboliziran je alicikličkom hidroksilacijom i oksidativnom *N*-dealkilacijom [3]. Strukturna formula je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Strukturna formula risperidona temeljena na rentgenskim kristalografskim podacima¹ [4]

Risperidon je u krutom stanju bijele ili bež boje, vrlo je slabo topljiv u vodi, djelomično topljiv u 96 %-tnom etanolu i dobro topljiv u diklormetanu. Dobro se otapa u kiselom mediju, kao što je 0,1 mol/L klorovodična kiselina te pokazuje polimorfizam [5,6].

Mehanizam djelovanja risperidona kao atipičnog antipsihotika je blokiranje receptora dopamina tipa 2 i serotoninina tipa 2, onemogućavajući komunikaciju između živčanih stanica [7]. Zanimljivo je da jedna molekula podjednako uspješno blokira receptore dvije tvari potpuno drugačijeg učinka: serotonin pospješuje anterogradne kretnje prema aksonima i krajevima dendrita, dok dopamin inhibira mitohondrijski transport [2,8,9]. Risperidon je dosada najuspješniji farmaceutski proizvod kojim se može liječiti šizofrenija ukoliko se

¹ Sve su strukture nacrtane u programu ACD/Chemsketch.

primjenjuje u dozama od 3 mg do 4 mg dnevno i to zbog nekoliko razloga. Osim što risperidon blokira receptore 5–hidroksitriptamina (5-HT)₂ i dopamina DA–D₂, utvrđeno je da vrlo sporo disocira, odnosno da je kompleks risperidon–receptor relativno neosjetljiv na varijacije u koncentraciji endogenih agonista receptora te na fluktuacije slobodne koncentracije samoga risperidona [4]. Njegovo je značajno djelovanje iskazano ne samo kroz stabilno blokiranje ovih dvaju receptora, već i kroz blokiranje α_1 i α_2 adrenergičkih receptora te receptora histamina H₁, čime je risperidon smanjio ili potpuno uklonio poznate nuspojave pri primjeni već poznatih antipsihotika u liječenju šizofrenije.

2.2. Metode analize risperidona i njegovih razgradnih produkata

Prema literaturi [5] risperidon se dobro apsorbira u organizmu. Koncentracije risperidona i njegovog aktivnog metabolita, 9-hidroksirisperidona, u plazmi, proporcionalne su dozi u rasponu od 1 mg do 16 mg dnevno. U plazmi se risperidon i njegov aktivni metabolit vežu za albumin i α 1-kiselinu glikoproteina na različitim mjestima u molekulama, s tim da je moć vezanja risperidona 90 %, a 9-hidroksirisperidona 77 %. Najviše risperidona metabolizira se u jetri, a iz organizma se izlučuje najvećim dijelom preko urina.

Objavljen je niz radova u kojima su raznim metodama, a ponajviše tekućinskom kromatografijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, određivana onečišćenja i razgradni produkti risperidona, koji je kao analit bio ugrađen u tablete (1 ili 2 mg), ili je bio u obliku injekcijske otopine masene koncentracije 0,5 mg/mL [4].

U radu Patela i suradnika [10] opisana je jednostavna i brza metoda tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti za kvantitativno određivanje risperidona. Metoda je dala rezultate kompaktnih vrpca za risperidon, s retencijskim faktorom $R_F = 0,34 \pm 0,01$. Najmanja količina risperidona koju je bilo moguće detektirati je 22,44 ng po vrpca, dok je limit kvantifikacije bio 68,01 ng po vrpca.

Prema radu Maslanke i suradnika [11] određena je stabilnost uzorka risperidona u obliku tableta od 4 mg u prisutnosti razgradnih produkata pomoću tankoslojne kromatografije. Zadovoljavajući rezultati kromatografske separacije postignuti su primjenom pokretne faze butanol-octena kiselina–voda (12:3:5) i stacionarne faze TLC-F₂₅₄ pločica prekrivenih silika gelom 60. Pri kiseljoj hidrolizi u vodenoj otopini 0,5 mol/L octene kiseline uočen je razgradni produkt s retencijskim faktorom 0,79, u odnosu na risperidon koji ima retencijski faktor 0,49. Pri baznoj hidrolizi u vodenoj otopini 0,5 mol/L natrijeve lužine, uočena su tri razgradna produkta s retencijskim faktorima 0,40, 0,48 i 0,72, dok je u prisutnosti vodikovog peroksida uočen jedan razgradni produkt risperidona s retencijskim faktorom 0,50. U radu nisu određivane strukture razgradnih produkata, već se autori zadržavaju samo na njihovim karakterističnim retencijskim faktorima.

Daljnijim pregledom literature nisu pronađeni drugi radovi koji opisuju određivanje razgradnih produkata tankoslojnom kromatografijom, već se njezina primjena fokusira na određivanje risperidona kao glavne komponente u različitim matricama.

Osim metode tankoslojne kromatografije, validiran je niz metoda tekućinske kromatografije za određivanje risperidona i njegovih razgradnih produkata. U radu Tomara i suradnika [12] određeni su razgradni produkti risperidona spregnutom tehnikom tekućinska kromatografija i spektrometrija masa pri alkalnoj i kiselj hidrolizi te pri oksidativnom stresu. U tekućinskoj kromatografiji korištena je Hypersil-BDS C₁₈ kolona, a kao pokretna faza smjesa amonijevog acetata i metanola u omjeru 70:30. Risperidon je eluirao s retencijskim vremenom 12 minuta, dok su razgradni produkti eluirali s retencijskim vremenima 8,5 i 11 minuta. Spektrometrijom masa određeno je da pri alkalnoj i kiselj hidrolizi nastaje 9-hidroksirisperidon, dok pri oksidativnom stresu nastaje N-oksid risperidon (biciklorisperidon), te su njihove strukture potvrđene ¹H i ¹³C NMR-om te UV-spektroskopijom.

Svirskis i suradnici [13] objavljuju da je razvijena metoda kromatografije obrnutih faza visoke djelotvornosti (RP-HPLC, engl. *Reversed-phase high-performance chromatography*) za određivanje otpuštanja risperidona s novosintetiziranog sustava lijekova baziranog na polipirolu. Tijekom alkalne i kisele hidrolize risperidona nastali su različiti razgradni produkti. Koristili su C₁₈ kolonu kao stacionarnu fazu, a smjesu acetonitrila i kalijevog dihidrogenfosfata u omjeru 45:55 kao pokretnu fazu. Kromatografski pikovi razgradnih produkata u kiselim uvjetima eluiraju 2,3 i 4,3 minute nakon risperidona koji ima retencijsko vrijeme 3 minute. U alkalnim uvjetima razgradni produkti eluiraju nakon 2,7 i 4,1 minute, ukazujući da pri alkalnoj i kiselj hidrolizi nastaju različiti razgradni produkti, što nije slučaj u radu Tomara [12]. Ono što je još zanimljivo jest da tijekom primjene razlike potencijala u iznosu od 2 V nije uočena razgradnja risperidona, dok je razgradnja uočena u vodenoj otopini vodikova peroksida.

Također je objavljen rad Jonesa i suradnika [14] u kojem je opisano određivanje risperidona i njegovog aktivnog metabolita 9-hidroksirisperidona u plazmi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Protok je bio je 0,6 mL/min, a vremena zadržavanja bila su 2,6 i 3,7 minuta slijedom za 9-hidroksirisperidon i risperidon. Potvrđena granica detekcije je 1,5 ng/mL.

Dedania je sa suradnicima [15] razvio te validirao stabilitetno-indikativnu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za određivanje risperidona ugrađenog u tablete. Ispitana je potaknuta razgradnja pri kiselj i alkalnoj hidrolizi, fotolitičkoj i termalnoj razgradnji te oksidativnom stresu. Kao stacionarna faza korištena je C₁₈ kolona, a kao pokretna faza smjesa metanola i acetonitrila u omjeru 80:20, s brzinom protoka 1 mL/min. Granica kvantifikacije određena je pri masenoj koncentraciji 5,44 µg/mL, a granica detekcije

pri 1,79 µg/mL. Tijekom kisele hidrolize detektiran je razgradni produkt s retencijskim vremenom 4,2 minute, dok je risperidon imao retencijsko vrijeme 3,45 minuta. Bazna hidroliza otkrila je razgradni produkt s retencijskim vremenom 2,62 minute. Pri oksidativnom stresu također je uočen jedan razgradni produkt s retencijskim vremenom 2,67 minuta. Termalna i fotolitička razgradnja rezultirale su jednakim razgradnim produktom koji je eluirao nakon 2,75, odnosno 2,76 minuta. Uočeni razgradni produkti nisu identificirani.

Prema USP monografiji [16] risperidon se određuje tekućinskom kromatografijom na dva načina, ovisno radi li se o krutom uzorku ili oralnoj otopini risperidona. Za određivanje risperidona u krutom uzorku kao pokretna faza preporučuje se smjesa pufera amonijevog acetata (5 g/L amonijevog acetata kojemu je dodana ledena octena kiselina do pH=6) i otopine A, koja se sastoji od acetonitrila i tetrahidrofurana (80:20) u omjeru 80:20. Temperatura kolone (dimenzije 4,6 mm × 15 cm, 5 µm pakiranje L1) je 50 °C, protok 1,5 mL/min i volumen injektiranja 10 µL. Vrijeme analize je 50 minuta.

Za određivanje risperidona prema EP monografiji [6] koristi se kolona duljine 10 cm i promjera 4,6 mm koja je napunjena oktadecil silika gelom deaktiviranog bazom. Pokretna faza je smjesa otopine amonijevog acetata masene koncentracije 5 g/L i metanola. Primjenjuje se gradijentno eluiranje, od 30:70 do 70:30 tijekom 22 minute. Protok je 1,5 mL/min i volumen injektiranja 10 µL [6].

Malen je broj radova objavljen za određivanje risperidona i njegovih razgradnih produkata primjenom kromatografije ultra visoke djelotvornosti. Waters [17] objavljuje uputu za validaciju UPLC/MS metode (engl. *Ultra Pressure Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) za određivanje risperidona i njegovog aktivnog metabolita, 9-hidroksirisperidona, u ljudskoj plazmi. Za validaciju je korištena BEH C₁₈ kolona i pokretna faza koja se sastoji od 2 mmol/L vodene otopine amonijevog acetata (pH=9) i metanola u omjeru 50:50. Protok je bio 0,6 mL/min, volumen injektiranja 5 µL/min, a vrijeme trajanja analize 1,25 minute.

Chen je sa suradnicima [18] validirao metodu kromatografije ultra visoke djelotvornosti za kvantitativno određivanje risperidona u injekcijskoj otopini Risperidal Consta. Za analizu UPLC-om korištena je BEH C₁₈ kolona povezana s predkolonom Van-Guard te smjesa acetonitrila i 10 mmol/L amonijevog acetata u omjeru 26:74. Protok je bio 0,3 mL/min. Granica kvantifikacije bila je 0,1 µg/mL, a metoda ima linearni odziv u rasponu masenih koncentracija od 0,1 µg/mL do 1,5 µg/mL. Budući da su napravili analizu otopine Risperdala

Consta metodom kromatografije visoke djelotvornosti te napravili transfer na kromatografiju ultra visoke djelotvornosti mijenjajući uvjete dok nisu postigli granice prihvatljivosti, važno je usporediti vrijednosti injekcijskoga volumena, koji je u HPLC-u bio 10 μ L, a u UPLC-u 3 μ L, te retencijska vremena risperidona, koja su bila 8,412 minuta za HPLC i 5,459 minuta za UPLC. UPLC-om su određena tri onečišćenja risperidona s pripadajućim retencijskim vremenima kako slijedi: risperidon *cis* N-oksid (R_F = 2,03 min), biciklorisperidon (R_F = 2,42 min) i Z-oksim (R_F = 2,99 min), dok ista onečišćenja utvrđena HPLC-om imaju veća retencijska vremena i šire pikove u kromatogramu.

Kao zaključak nameće se da tankoslojna kromatografija i tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, u usporedbi s UHPLC-om zahtijevaju puno veće količine pokretnih faza (zbog većeg protoka) i zbog toga se smatraju neekološkim i financijski neisplativijim. Drugi vrlo važan nedostatak HPLC-a pred UHPLC-om je puno duže vrijeme analize (i opet samim time dodatno veća potrošnja pokretne faze).

2.3. Identifikacija razgradnih produkata risperidona

U literaturi je opisana identifikacija razgradnih spojeva risperidona nastalih reorganizacijom izoksazolnog prstena pod utjecajem topline i svjetlosti, koji su prikazani u Tablici 1. Navedeni spojevi su identificirani NMR spektroskopijom, spektroskopijom masa, te FT-IR spektroskopijom [19]. Osim razgradnih produkata prikazanih u Tablici 1. istim je tehnikama, uz dodatnu rentgensku difrakciju na monokristalu, određena struktura još dva onečišćenja, jednog polarnog i jednog nepolarnog, koja su opisana u radu Sattanathana i suradnika [7].

Prema USP monografiji [16] određeno je 8 onečišćenja risperidona sa sljedećim retencijskim faktorima: E-oksim (R_F = 0,52), Z-oksim (R_F = 0,64), 9-hidroksirisperidon (R_F = 0,71), desfluoro risperidon (R_F = 0,79), risperidon difluoroketon (R_F = 0,90), 5-fluororisperidon (R_F = 0,94), spoj G strukturno sličan risperidonu (R_F = 1,08) i 6-metilrisperidon (R_F = 1,44)² [16]. Od navedenih 8, 7 onečišćenja strukturno je prikazano u Tablici 1 te im je dan pripadajući naziv prema IUPAC-u. Za spoj G strukturno sličan risperidonu u USP monografiji [16] navedeno je da nije relevantan za sve procese dobivanja risperidona te stoga i nije određen nazivom niti strukturom.

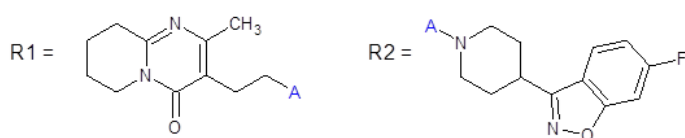
² Risperidon ima retencijski faktor R_F = 1.

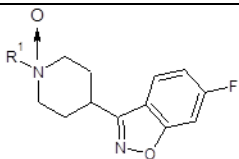
Prema EP monografiji [6] identificirano je 5 onečišćenja sa sljedećim retencijskim faktorima: onečišćenje A ($R_F = 0,7$), onečišćenje B ($R_F = 0,75$), onečišćenje C ($R_F = 0,8$), onečišćenje D ($R_F = 0,94$) i onečišćenje E ($R_F = 1,1$). Kromatografski pik risperidona ima retencijsko vrijeme 12 minuta te je njegov retencijski faktor 1,0 [6]. Svih 5 onečišćenja prikazano je u Tablici 1. Osim navedenih onečišćenja, tekućinskom je kromatografijom moguće detektirati još neke razgradne produkte (onečišćenja K, F, H, I, J, L i M) [6] koji su također prikazani u Tablici 1.

U radu El – Sherifa i suradnika [20] opisana je validacija metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tankoslojne kromatografije u svrhu određivanja risperidona u prisutnosti razgradnih produkata prikazanih u Tablici 1 [20]. Slična su istraživanja objavljena u drugim radovima, no usko su vezana samo za validaciju tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, koja u usporedbi s UHPLC-om zahtijeva duže vrijeme analize te veći utrošak kemikalija zbog većeg protoka mobilnih faza [3, 21].

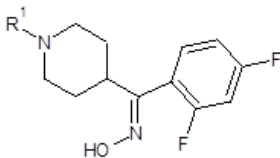
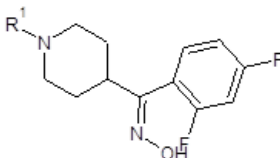
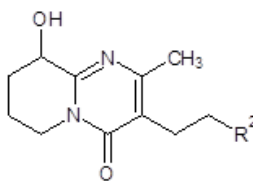
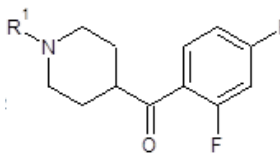
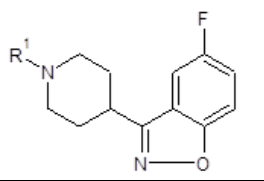
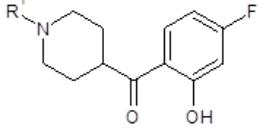
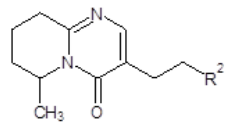
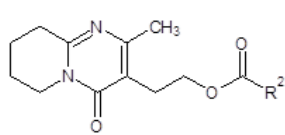
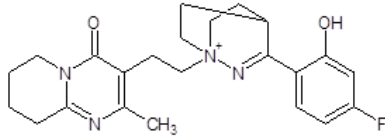
Tablica 1. Strukturne formule i nazivi onečišćenja risperidona

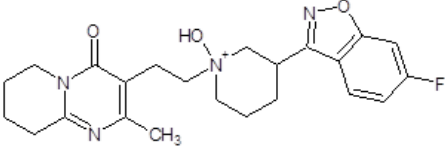
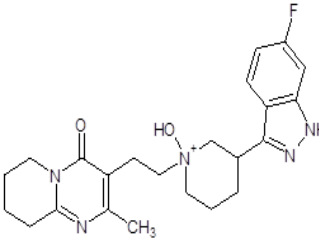
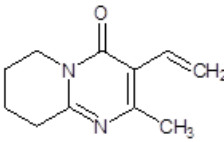
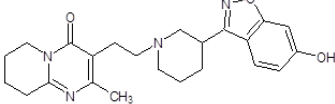
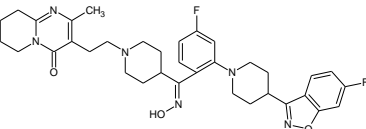
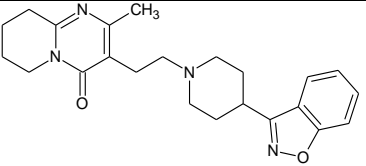
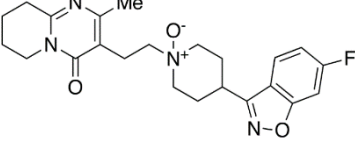
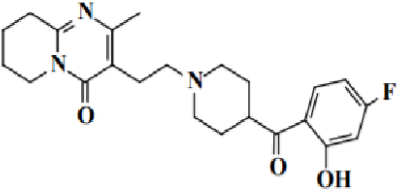
Ogranci R1 i R2 predstavljaju:



Trivijalno ime	IUPAC-ov naziv	Struktura	Naziv spoja prema	
			EP monografiji	USP monografiji
Onečišćenje I [19]	6-fluoro-3-(piperidin-4-il)-1,2-benzisoksazol	$H-R^2$	Onečišćenje M	/
Onečišćenje II [19]	3-(2-kloroetil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido [1,2-a] pirimidin-4-on	R^1-Cl	Onečišćenje L	/
Onečišćenje III ³ [19]	2-[2-metil-4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido [1,2-a] pirimidin-3-il]etil 4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-karboksilat		Onečišćenje F	/

³ Onešćenje III prikazano u tablici određeno je kao razgradni produkt N-oksida u radu Tomara [12].

Trivijalno ime	IUPAC-ov naziv	Struktura	Naziv spoja prema	
			EP monografiji	USP monografiji
Onečišćenje IV [19]	3-[2-[4-[(<i>E</i>)-(2,4-difluorofenil(hidroksi-imino)metil)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje A	E-oksim
Onečišćenje V [19]	3-[2-[4-[(<i>Z</i>)-(2,4-difluorofenil(hidroksi-imino)metil)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje B	Z-oksim
Onečišćenje VI [19]	(9 <i>RS</i>)-3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-9-hidroksi-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje C	9-hidroksi risperidon
Onečišćenje VII [19]	3-[2-[4-(2,4-difluorobenzil)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje H	Risperidon difluoro keton
Onečišćenje VIII [19]	3-[2-[4-(5-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje D	5-Fluoro risperidon
Onečišćenje IX [19]	3-(2-(4-(4-fluoro-2-hidroksibenzil)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-one		/	/
Onečišćenje X [19]	(6 <i>RS</i>)-3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2,6-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-4-on		Onečišćenje E	6-Metilrisperidon
Onečišćenje XI [19]	2-(2-metil-4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-3-yl)etil 4-(6-fluorobenzodizoksazol-3-il)piperidin-1-karboksilat		/	/
Razgradni produkt I [20]	3-(4-fluoro-2-hidroksi-fenil)-6-[2-(2-metil-4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4 <i>H</i> -pirido [1,2- <i>a</i>] pirimidin-3-il)-etil]-2-aza-1-azonia-biciklo[2.2.2]okt-2-en		/	Bicikloris peridon

Trivijalno ime	IUPAC-ov naziv	Struktura	Naziv spoja prema	
			EP monografiji	USP monografiji
Razgradni produkt II [20]	3-[2-[4-[4-fluoro-2-[4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on		Onečišćenje I	/
Razgradni produkt III [20]	4-(6-fluoro-benzo[d]izoksazol-3-il)-1-hidroksi-1-[2-(2-metil-4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)-etil]-piperidin		/	/
Razgradni produkt IV [20]	3-etenil-6,7,8,8-tetrahidro-2-metil-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on		/	/
Razgradni produkt V [20]	6,7,8,9-tetrahidro-3-[2-[4-(6-hidroksi-1,2-benzizoksazol-3-il)-1-piperidinil]etil]-2-metil-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on		/	/
Onečišćenje J [6]	3-[2-[4-[(Z)-[4-fluoro-2-[4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)piperidin-1-il]fenil](hidroksiimino)metil]piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on		Onečišćenje J	/
Onečišćenje K [6]	3-[2-[4-(1,2-bezoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro[1,2-a]pirimidin-4-on		Onečišćenje K	Desfluoro risperidon
Onečišćenje Q [22]	3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzizoksazol-3-il)-1-oksidopiperidin-1-im-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]pirimidin-4-on			N-oksid
Onečišćenje G [23]	3-[2-[4-(4-fluoro-2-hidroksibenzoil)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on			Onečišćenje G

U ovom radu validirana je metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) za određivanje risperidona, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. Usporedbom metode validirane u ovom radu sa prethodno opisanim metodama određivanja risperidona u prisustvu onečišćenja i razgradnih produkata sa metodom iz USP farmakopeje, utvrđeno je da je vrijeme analize primjenom UHPLC-a skraćeno za više od 4 puta, dok je upotreba otapala smanjena za više od 22 puta, što ukazuje na to da je UHPLC tehnika budućnosti [1].

2.4. Validacija

Validacija je skup postupaka kojima se dokazuje da bilo koja procedura, proces, oprema, materijal, aktivnost ili sustav djeluje očekivano pri određenim uvjetima i pri tome postiže zadovoljavajuću razinu određenih parametara. Validacijom se potvrđuje da analitička metoda rezultira točnim, pouzdanim i konzistentnim podacima [24-26]. Također se potvrđuje da je metoda ponovljiva i da je neovisna o osobama koje ju provode, mjestima na kojima se provodi, upotrebi različitih reagensa ili radu na različitim uređajima. Najznačajnija prednost validacije analitičkih metoda je izgradnja određenoga stupnja pouzdanosti u metodu. Postoji niz preporuka prema kojima se provodi validacija metode a najčešće korištene su smjernice koje propisuje Internacionalna organizacija za harmonizaciju (ICH, engl. *International conference on harmonization*) – poglavlje Q2 "Validacija analitičkih procedura" i Organizacija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and drug administration*) – "Analitičke procedure i validacija metoda lijekova".

Proces validacije sastoji se od nekoliko faza. U prvoj fazi se definira svrha, odnosno cilj metode, analit koji će se testirati i mjeriti, očekivani raspon koncentracije, okolina (matriks), oprema na kojoj će se raditi i lokacija. Druga faza obuhvaća definiranje kriterija validacije, a to su kriteriji prihvatljivosti određivanih parametara i karakteristike djelovanja, kao što su priprema i izvedba eksperimenata. Treća faza obuhvaća razvoj plana za kontrolu kvalitete za rutinske analize i naposljetku faza izrade validacijskog izvješća i dokumentacije [25].

Parametri validacije metode su:

1. Specifičnost
2. Selektivnost (utjecaj matriksa)
3. Potaknuta razgradnja
4. Linearnost
5. Područje primjene

6. Točnost
7. Preciznost (ponovljivost i intermedijaska preciznost)
8. Granica detekcije
9. Granica kvantifikacije
10. Robusnost
11. Stabilnost otopina uzorka i standarda [26]

Svaki od nabrojenih parametara detaljnije je opisan u narednim poglavljima.

2.4.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost je mogućnost jednoznačnog određivanja analita u prisutnosti drugih komponenti, a provjerava se ispitivanjem utjecaja placeba i potaknutom razgradnjom. Selektivnost je pak sposobnost da se analit od interesa odvoji od poznatih onečišćenja. Cilj testiranja ovih parametara je osigurati da komponente matriksa ne utječu značajno na konačni rezultat analize. Osim procjene utjecaja matriksa, koja se ispituje analiziranjem pripremljenog placeba prema predloženoj metodi analize, treba se napraviti procjena stabilitetno - indikativnih⁴ karakteristika metode, što se ispituje potaknutom razgradnjom uzorka [27].

Budući da se za metodu koja je specifična podrazumijeva da može mjeriti odziv samo jednoga analita, radije se govori o parametru selektivnosti kojim se može razlikovno kvantificirati ciljna jedinka u prisutnosti drugih [26]. Za kromatografske metode potrebno je ispitati čistoću pika kako bi se osiguralo da pik analita ne interferira značajno s pikovima razgradnih spojeva ili placeba [28,29].

2.4.2. Linearnost

Linearnost definira područje primjene metode, a odnosi se na mogućnost metode da u zadanom području daje rezultate koji su direktno ili prema definiranoj matematičkoj transformaciji proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.

Cilj testiranja ovoga parametra je procjena hoće li kalibracija koja je direktno proporcionalna koncentraciji dati dovoljnu točnost rezultata u cijelom planiranom području primjene metode. Otopine za ispitivanje linearnosti pripremaju se razrjeđivanjem iz jedne koncentrirane otopine. Linearnost treba biti provjerena na najmanje pet točaka u prikladnom radnom području [30,31].

⁴ Tijekom analize ne smije doći do preklapanja signala analita sa signalima mogućih produkata razgradnje.

2.4.3. Područje rada metode

Ovaj je parametar validiran potvrdom da metoda ima prihvatljivu linearnost, točnost i preciznost kada se primjenjuje na uzorke koji se nalaze na rubu područja rada kao i unutar njega. Kod određivanja područja rada metode potrebno je uzeti u obzir dozvoljene varijacije prilikom vaganja uzorka i standarda, koncentraciju uzorka i standarda, te druge eksperimentalne varijable [26,27,29,30].

2.4.4. Točnost

Točnost analitičke metode predstavlja sličnost dobivenog rezultata sa stvarno sadržanom količinom komponente koja se određuje. Točnost metode na gotovom farmaceutskom proizvodu mjeri se tako da se placebo cijepi poznatom količinom standarda u nekoliko točaka koncentracije, pokrivajući cijelo područje rada metode. Ispitivanje točnosti potrebno je napraviti na najmanje tri koncentracijska nivoa, i pripremiti najmanje tri uzorka po koncentracijskom nivou. Točnost se provodi na glavnoj aktivnoj komponenti, u ovom radu risperidonu, te na svim dostupnim poznatim razgradnim produktima. Točnost se ispituje na cijelom području rada metode [30,31].

2.4.5. Preciznost

Preciznost analitičke metode predstavlja ponovljivost rezultata kroz minimalno šest serija mjerenja napravljenih analizom istog homogenog uzorka. Preciznost se može razmatrati na tri nivoa: ponovljivost, intermedijska preciznost (unutar laboratorija) i reproducibilnost (između 2 laboratorija), no reproducibilnost nije potrebno potvrđivati tijekom validacije. Ponovljivost se određuje uzastopnom analizom uzoraka uzetih od istog homogenog uzorka na istom instrumentu, pripremljenim od strane istog analitičara. Intermedijska preciznost je pak mogućnost metode da proizvodi dosljedne i pouzdane rezultate tijekom vremena uz različite uvjete testiranja (različit instrument, analitičar, kromatografska kolona, kemikalije). Validacija reproducibilnosti važna je ako se određena metoda koristi u različitim laboratorijima jer brojni čimbenici utječu na reproducibilnost, kao što je razlika u sobnoj temperaturi, vlazi zraka ili u opremi s različitim karakteristikama [32,33].

2.4.6. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije je najniža koncentracija analita koja se može detektirati, no ne nužno i kvantificirati. Određuje se na temelju omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije, čija je prihvaćena vrijednost 3:1. Granica kvantifikacije je pak najmanja koncentracija analita u uzorku koja je određena s prihvatljivom preciznošću i točnošću u definiranim

uvjetima. Za određivanje granice kvantifikacije koristi se omjer signala kromatografskog pika i šuma 10:1. Mjeri se analiziranjem uzoraka analita poznatih koncentracija, te određivanjem najmanjeg nivoa s održivom i prihvatljivom točnošću i preciznošću. U većini je slučajeva granica kvantifikacije (LOQ, engl. *limit of quantification*) dvostruko, odnosno trostruko veća od granice detekcije (LOD, engl. *limit of detection*) [24].

2.4.7. Robusnost

Ovaj parametar označava otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Kod ispitivanja robusnosti mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Parametre koji bi mogli utjecati na rezultate metode potrebno je držati pod nadzorom i jasno ih označiti kod opisa metode. Kod instrumentalnih metoda, kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti tipični parametri su variranje vrijednosti pH vodene pokretne faze, variranje sastava pokretne faze te korištenje različitih serijskih brojeva kromatografskih kolona, rad pri različitim temperaturama i protocima [28]. Tradicionalni pristup ispitivanju robusnosti je da se ispituje utjecaj izmjene jednog po jednog parametra. Međutim takvo ispitivanje rijetko opisuje promjene koje se mogu uvesti u svakodnevnom radu sa metodom. Da bi dobili podatke o svojstvima metode prilikom izmjene više parametara istovremeno, korišten je računalni program DryLab.

2.4.8. Stabilnost otopina uzorka i standarda

Kako bi se dobili ponovljivi i pouzdani rezultati, potrebno je provjeriti stabilnost otopina standarda i uzorka u razumnom vremenskom periodu, primjerice svakih sat vremena u vremenskom periodu od 46 sati. Stabilnost otopina uzorka i standarda treba se potvrditi serijom eksperimenata u kojima su uzorci podložni realno očekivanim uvjetima skladištenja [25].

2.4.9. Potaknuta razgradnja

Potaknuta razgradnja je postupak kojim se uzorak razgrađuje pri agresivnim uvjetima kako bi bilo moguće razviti i validirati metodu sa stabilitetno – indikativnim karakteristikama, odrediti razgradni put aktivne supstance, odrediti razgradne spojeve, te u konačnici razumjeti kemiju aktivne tvari s ciljem određivanja potencijalnih stabilizatora i optimalnih uvjeta za dugoročno skladištenje farmaceutske tvari [34].

Metode potaknute razgradnje su: hidroliza (u alkalnom i kiselom mediju), termalni, svjetlosni i oksidativni stres. Prihvatljive granice razgradnje su između 5 % i 20 %, dok se

optimalnom razgradnjom smatra 10 %-tna razgradnja aktivne komponente. Međutim, potaknuta razgradnja ne mora i neće uvijek rezultirati razgradnim produktom, čak se može i prekinuti ako nije uočena pojava razgradnog produkta nakon izlaganja stresnim uvjetima, što bi značilo da je uzorak stabilan i otporan na stresne uvjete. S druge strane, pretjerano izlaganje uzorka može uzrokovati nastanak sekundarnih razgradnih produkata koji inače ne bi nastali stajanjem lijeka u umjerenim uvjetima, stoga pri potaknutoj razgradnji treba pratiti smjernice koje preporučuje Međunarodna konferencija o harmonizaciji (ICH) [35].

ICH smjernice ne definiraju točnu temperaturu termalnoga stresa, već se ona određuje od slučaja do slučaja, no preporuča se da se termalni stres provodi povećanjem temperature u razmacima od 10 °C u prikladnom temperaturnom rasponu, primjerice od 40 °C do 80 °C [36,37].

Hidroliza se provodi pri sobnoj temperaturi, najčešće dodatkom klorovodične kiseline ili natrijeve lužine u rasponu množinskih koncentracija od 0,1 do 1,0 mol/L u vremenskom trajanju ne duljem od sedam dana [36], no prema drugoj literaturi [37] trajanje hidrolize ne bi trebalo biti dulje od 5 dana. Ukoliko produkti hidrolize izostanu pri sobnoj temperaturi, primjenjuje se viša temperatura, od 45 °C do 75 °C. Razgrađeni se uzorak naposljetku neutralizira pogodnim reagensom kako bi se izbjegao daljnji raspad [36].

Za oksidaciju uzorka upotrebljava se vodikov peroksid, u rasponu masenoga udjela od 0,001 % do 0,1 % pri sobnoj temperaturi, no česti su i drugi reagensi: *terc* – butilhidroperoksid, ozon te metalni ioni kao što su željezo(III) i bakro(II) ion. Europska farmakopeja predlaže oksidativnu proceduru korištenja 0,005 % - tnog vodikovog peroksida u vremenskom trajanju od 20 sati na temperaturi 37 °C [35,37].

Ispitivanja fotostabilnosti provode se izlažući uzorak vidljivom zračenju snage $1,2 \times 10^6$ lx/h u rasponu valnih duljina od 400 nm do 800 nm, i najmanje 200 Wh/m² ultraljubičastoga zračenja u rasponu valnih duljina od 320 nm do 400 nm. Najčešći mehanizam razgradnje ovakvo tretiranog uzroka je radikalski [36].

U dostupnoj literaturi [3] opisan je postupak potaknute razgradnje risperidona koja je provedena pri sljedećim uvjetima: hidroliza vodene otopine risperidona masene koncentracije 0,5 mg/mL provedena je dodatkom 10 mL 5 mol/L klorovodične kiseline te nakon 10 sati neutralizacija dodatkom 10 mL 5 mol/L natrijeve lužine. Oksidativni stres proveden je dodatkom 3,5 mL 3 %-tne vodene otopine vodikova peroksida pri sobnoj temperaturi te je

otopina analizirana nakon 5 minuta. Ispitivanje fotostabilnosti provedeno je u transparentnoj fotolitičkoj posudi izlažući uzorak risperidona zračenju snage $1,2 \times 10^6$ lx/h. Rezultati eksperimenta pokazali su da je uzorak risperidona stabilan pri svim uvjetima osim fotolitičkog stresa, gdje je uočena razgradnja od 11 %.

Prema radu Mašlanke i suradnika [11] u kojem je opisano određivanje risperidona u prisutnosti razgradnih produkata metodom tankoslojne kromatografije, zaključeno je da je koeficijent brzine reakcije najveći u vodenoj otopini 0,9 mol/L vodikovog peroksida ($k = 0,0926 \text{ h}^{-1}$), zatim slijedi koeficijent brzine reakcije u lužnatoj otopini 0,5 mol/L natrijeve lužine ($k = 0.0692 \text{ h}^{-1}$) i naposljetku u kiseloj sredini 0,5 mol/L octene kiseline ($k = 0.0334 \text{ h}^{-1}$) što ukazuje da je razgradnja risperidona najbrža u vodenoj otopini vodikova peroksida, dok je risperidon najstabilniji u vodenoj otopini octene kiseline.

2.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

2.5.1. Teorijska podloga

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja sastojaka iz smjese na temelju distribucije komponenata između dviju faza, stacionarne i pokretne. Kromatografski se proces odvija kao rezultat ponavljanja procesa sorpcije i desorpcije tijekom kretanja komponenata uzorka otopljenih u pokretnoj fazi uzduž stacionarne faze.

Tekućinska kromatografija u kojoj se upotrebljavaju stacionarne faze vrlo malih čestica, promjera od 3 μm do 20 μm , uz relativno visok tlak (do 400 bara) pokretne faze na ulazu u kolonu naziva se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High pressure liquid chromatography*). Učinkovitost kromatografske kolone izražava se brojem teoretskih tavana N , kojim je iskazan broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i stacionarne faze. Računa se prema jednadžbama 1 i 2,

$$N = \frac{V^2}{\sigma^2} = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (1)$$

$$N = 16 \frac{V^2}{\omega_b^2} = 16 \frac{t^2}{\omega_b^2} \quad (2)$$

gdje je N broj teoretskih tavana, V volumen zadržavanja analita, t vrijeme zadržavanja analita, σ standardno odstupanje Gaussove krivulje, odnosno širina kromatografskog pika te ω_b širina pika pri osnovici kromatografskog pika. Učinkovitost se može izraziti i visinom tavana H koja se računa prema jednadžbi 3,

$$H = \frac{N}{L} \quad (3)$$

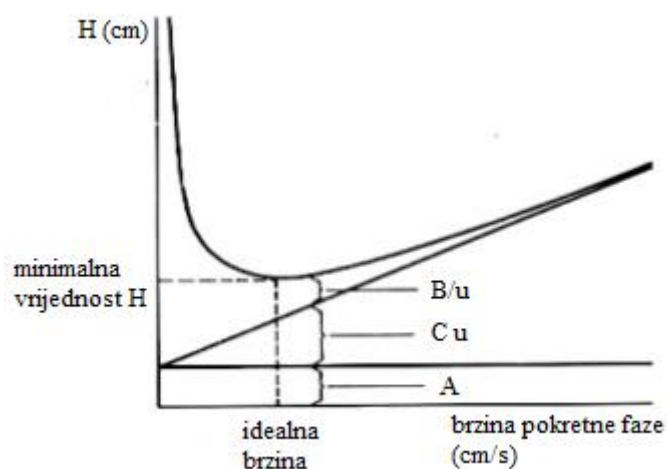
gdje je H visina tavana, L duljina kolone, a N broj teoretskih tavana.

Ovisnost linearne brzine pokretne faze i visine teoretskih tavana opisuje van Deemterova jednadžba 4,

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_M)u \quad (4)$$

gdje je u linearna brzina pokretne faze, A vrtložna difuzija, omjer B i u longitudinalna difuzija, $(C_M + C_s)u$ član koji govori o prijenosu mase između pokretne C_M i stacionarne faze C_s . Član A van Deemterove jednadžbe opisuje širenje kromatografske zone analita zbog difuzije molekula analita unutar pakirane kromatografske podloge. Član B je pak posljedica

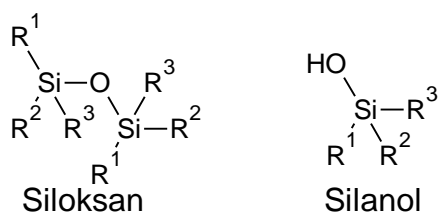
činjenice da se molekule analita kreću vlastitom difuzijom kroz kolonu, ne prenose se samo pasivno pokretnom fazom kroz kolonu.



Slika 2. Van Deemterov graf [38]

Na temelju van Deemterove jednadžbe može se zaključiti da je djelotvornost kromatografskog razdvajanja veća što je pokretna faza manje viskoznosti, što su čestice čvrste stacionarne faze manje te što je stacionarna faza homogenija.

Najčešće korištene stacionarne faze baziraju se na silicijevom dioksidu. Površina silicijevog dioksida sastoji se od mreže silanolnih grupa, od kojih neke mogu biti povezane vodikovim vezama s vodom, i siloksanskih grupa, kako je prikazano na Slici 3 [39].



Slika 3. Dvije karakteristične skupine na površini silicijevog oksida [34]

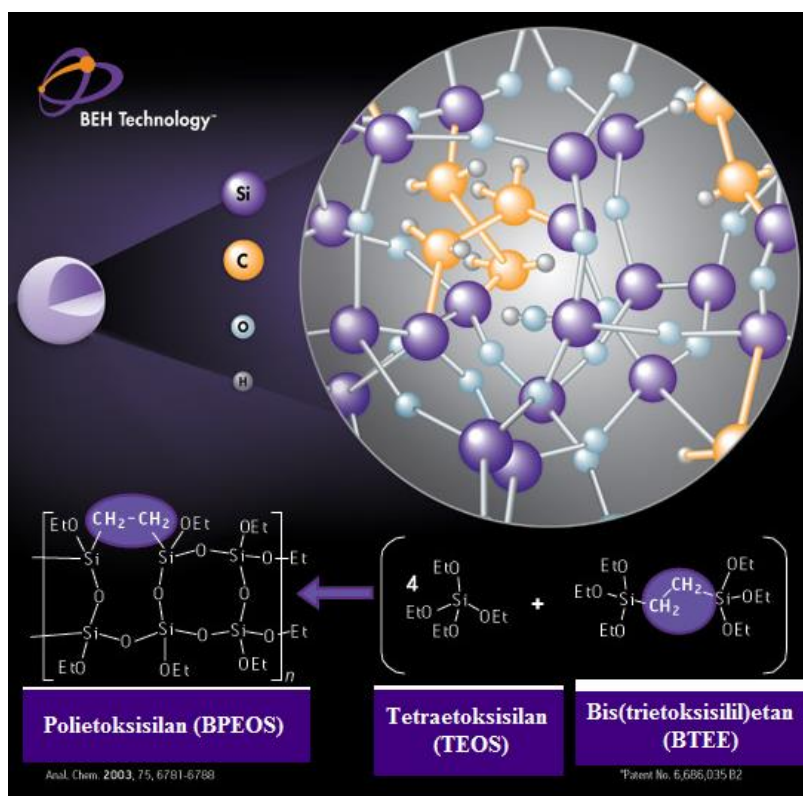
Površina silicijevog dioksida je jako polarna, stoga se ona kemijski derivatizira pogodnim reagensima kako bi bila primjenjiva u kromatografiji obrnutih faza. Najčešće kemijske derivatizacije obuhvaćaju kemijske reakcije silanolnih grupa s alkil-(C_1 , C_4 , C_8 ili

C₁₈), fenil-, cijano- i amino- kloridima, ili primjenjujući neku drugu dobru izlazeću skupinu kao što je klor. Derivatizacija alkilnim grupama (C₈ i C₁₈), između ostalog, ima ulogu steričke zaštite hidrolitički osjetljivih silanolnih grupa, no ipak, čak ni kemijska derivatizacija ne povećava mnogo raspon vrijednosti pH u kojem su silanolni oblici stabilni, a to je raspon vrijednosti pH od 2 do 8 [36].

2.5.2. Razvoj tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti je poboljšani oblik tekućinske kromatografije u kojem su primijenjeni tlakovi od 600 bara do 1400 bara. Kolone u UHPLC-u sadrže čestice punila manje od 2 µm, dok je unutarnji promjer kolone od 2 mm do 3 mm. Prednost upotrebe UHPLC-a je skraćeno vrijeme analize (od 3 do 40 puta [40,41]), do 3 puta veća rezolucija, upotreba manje količine organskih otapala i manje količine uzorka, što prati trend „zelene kemije“. Schmidt i Molnár objavili su članak o validaciji UHPLC metode za kvantitativno određivanje ebastina, H₁ antimistaminika [42], gdje je vrijeme analize skraćeno za 40 puta u usporedbi s HPLC metodom [43].

Ograničenja pak predstavljaju viša cijena instrumentacije (od 20 % do 50 %) i kompatibilnost s korištenim HPLC metodama [40]. Problem mehaničke stabilnosti stacionarnih faza u UHPLC-u riješen je otkrićem i primjenom hibridnih čestica povezanih etilenskim mostovima (BEH), a dodatna prednost primjene ovakvih čestica jest veći raspon pH vrijednosti u kojem su stabilne, a to je vrijednost pH od 1 do 12 [44]. Ovisno o analitima BEH čestice mogu se kemijski derivatizirati alkilnim ili amidnim lancima, kao što je objavljeno u radu Novákova i suradnika, radi brže i uspješnije detekcije polarnih pteridina [45]. Na Slici 4 prikazana je struktura BEH čestica.



Slika 4. Kemijska struktura BEH čestica [40]

Kod izbora pokretnih faza najčešće se koristi smjesa acetonitrila kao manje polarnog, i metanola kao jače polarnog organskog otapala [35,37,41,42], iako se u kombinaciji s acetonitrilom može koristiti propan-2-ol [46] ili mravlja kiselina [35]. Izbor pufera ovisi o željenoj vrijednosti pH, a najčešći su izbor amonijačni i acetatni pufer [35,37,41,42,46]. UHPLC-kompatibilni detektori su UV i MS detektor, detektor indeksa loma (RI), detektor nabijenog aerosola (CAD) i detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku (ELSD) [35]. Prikaz instrumenta za provođenje UHPLC eksperimenta prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Instrument UHPLC

2.6. Program DryLab

DryLab je računalni program koji se koristi za razvoj i optimizaciju HPLC, odnosno UHPLC metoda. Na temelju nekoliko točno definiranih analiza, te unešenih kromatograma ovaj računalni program radi predikcije kromatograma, širina pikova, rezolucija i vremena zadržavanja analita u mnogo širem spektru eksperimentalnih uvjeta nego što bi to bilo moguće u laboratoriju.

U njemu se točno i brzo može simulirati kromatogram separacija dok se simultano mijenja više inicijalno ispitanih kromatografskih parametara, kao što su pH vrijednost pufera, protok pokretne faze, temperatura, dimenzije kolone, parametri samog instrumenta te eluiranje pri gradijentnim i izokratnim uvjetima⁵, čime se može provjeriti robusnost same metode [43]. U ovom radu DryLab program je korišten za potrebe procjene robusnosti metode. Postoji više načina obrade i unosa podataka u DryLab. Za razradu robusnosti metode korišten je TgT (engl. *Temperature-Gradient Time*) način analize. Pri takvom načinu rada provode se 4 analize istog uzorka:

1. Niska temperatura kolone i kratko vrijeme analize
2. Niska temperatura kolone i dugo vrijeme analize
3. Visoka temperatura kolone i kratko vrijeme analize
4. Visoka temperatura kolone i dugo vrijeme analize

Ostali kromatografski parametri: protok, vrsta pokretne faza, valna duljina detekcije, vrsta kromatografske kolone ostaju nepromijenjeni.

Na temelju 4 dobivenih kromatograma, DryLab softver provodi izračune i prikazuje rezultate za teoretski pretpostavljene 297 analiza u kojima mijenja sve kromatografske parametre.

Krajnji rezultat govori da li je rezolucija između svih komponenti u kromatogramu zadovoljavajuća (na primjer do bazne linije, odnosno veća od 1,5) pri promijeni kromatografskih parametara koje postavlja korisnik (unutar željenog područja ispitivanja robusnosti).

⁵Kod izokratnog eluiranja koristi se jedno otapalo stalnog kemijskog sastava, no bolji se rezultati postižu gradijentnim eluiranjem, kada se sastav mobilne faze stalno mijenja [37].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Oprema i instrumenti

- **Kromatograf:** Acquity UPLC H-Class (Waters, SAD)
 - Kvatenarna pumpa
 - Detektor: PDA
 - Automatski uzorkivač sa kontrolom temperature
 - Injektorski sustav
- **Kromatografska kolona:**
 - Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plis C18, 2,1×50mm, 1,8μm (p/n 959757-902)
- **Računalni programi**
 - DryLab Software (Molnar Institut, Berlin)
 - Waters ®Empower™ softver
- **Ostala oprema:**
 - Mikrovaga, model XP56 (Mettler-Toledo AG Švicarska)
 - pH metar, model PHM220 (Radiometer Analytical SAS, Francuska) s kombiniranom Ag/AgCl elektrodom, model PHC2001-8 (Radiometer Analytical SAS; Francuska)
 - Ultrazvučna kupelj, Sonrex digital 10P (Bandelin, Njemačka)
 - Membranski filtri za pokretnu fazu, RC58, veličina pora 0,2 μm (Whatman, Njemčka)

3.2. Kemikalije

- Risperidon radni standard, USP, Lot.1604676
- Risperidon aktivna farmaceutska supstancija, šifra: 1697, ser.br.01
- Risperidon Z-oksim, Cat#R525016, Lot#3-SRR-83-2
- Desfluoro-risperidon, Cat#290065, Lot#4-LXS-8-1
- Risperidon E-oksim, Lot#3-SRR-85-2
- Risperidon N-oksid, Cat#R525010, Lot#4-MNZ-55-1
- 6-metil-risperidon, Cat#M326330, Lot#1-AKT-103-3
- 5-fluoro-risperidon, Cat#F595925, Lot#3-CSZ-93-2
- Biciklo-risperidon, Lot#1570-081A2
- Risperidon smjesa G, CAT.NO.1604756, Lot#F0M556
- Ph. Eur., Code:Y0000370, batch: 4.1
- USP referentni standard, Risperidon smjesa, CAT.NO.1604665, Lot # F0G225

Za validaciju metode korištena su sljedeća otapala i reagensi

- Visoko pročišćena voda
- Metanol, gradient grade for LC, reag. Ph Eur (Merck, Njemačka)
- Acetonitril, gradient grade for LC, reag. Ph Eur (Merck, Njemačka)
- Vodikov peroksid 30 % (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- Octena kiselina 98 %-100 % (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- 1 mol dm⁻³ klorovodična kiselina (p.a.) (Merck, Njemačka)

3.3. Parametri analitičke metode

Kromatografski parametri UHPLC metode za određivanje razgradnih produkata risperidona opisani u Tablici 2.

Tablica 2. Kromatografski parametri analize risperidona i njegovih razgradnih produkata

Kromatografska kolona	Acquity UPLC BEH C18 (3,0 × 150 mm)		
Temperatura kolone	45 °C		
Brzina protoka	0,35 mL/min		
Valna duljina detekcije	278 nm		
Vodena pokretna faza (A)	1 mL trietilamina u 1000 mL vode		
Organska pokretna faza (B)	Metanol		
Gradijent	Vrijeme / min	A / %	B / %
	0.0	45	55
	15.0	30	70
	15.1	45	55
	18.0	45	55
Temperatura automatskog uzorkivača	25 °C		
Volumen injektiranja	6,0 µL		

3.4. Priprema pokretnih faza i otapala

3.4.1. Priprema vodene pokretne faze

Za pripravu vodene pokretne faze pipetiran je 1,0 mL trietilamina (TEA) u 1000 mL vode, miješanjem na magnetskoj miješalici. Vrijednost pH je podešena dokapavanjem octene kiseline na vrijednost pH = 9,8 pri sobnoj temperaturi. Otopina je filtrirana preko filtera veličina pora 0,2 µm direktno u staklenu bocu od 1 L.

3.4.2. Priprema otapala

Kao otapalo korištena je smjesa pripremljena miješanjem metanola i vodene pokretne faze u omjeru 70:30. Otopina je filtrirana preko filtera veličine pora 0,2 µm.

3.5. Priprema uzoraka

3.5.1. Priprema otopina standarda

Za svaku analizu u duplikatu su priređene otopine radnog standarda risperidona masene koncentracije 0,0002 mg/mL. Pripremljene su na način da je vagano oko 2 mg radnog standarda risperidona u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno otapalom do dvije trećine tikvice. Potom su tikvice stavljene na ultrazvučnu kupelj 15 minuta nakon čega su dopunjene otapalom do oznake. Iz svake tikvice pipetirano je 0,1 mL, te razrijeđeno otapalom u tikvici od 50 mL. Otopine standarda rađene su u duplikatu kako bi se potvrdilo da nije došlo do pogreške prilikom vaganja ili razrjeđivanja.

3.5.2. Priprema uzoraka za određivanje linearnosti

Studija linearnosti provedena je sa standardom glavne aktivne komponente risperidonom i sa komercijalno dostupnim standardima poznatih onečišćenja: EP onečišćenja B, D, E, G, K, Q i biciklorisperidon.

Za svaku komponentu pripremljena je stock otopina koja se dalje razrjeđivala na 3 koncentracijska nivoa da bi se dobile otopine željene koncentracije. Stock otopina priređena je vaganjem oko 2 mg svakog poznatog onečišćenja i risperidona u tikvicu od 20 mL. Tikvica je nadopunjena otapalom do dvije trećine volumena, stavljena na ultrazvučnu kupelj 15 minuta i

nakon toga nadopunjena do oznake. Otopine za ispitivanje linearnosti dobivene se razrijeđivanjem stock otopine na način opisan u Tablici 3.

Tablica 3. Priprema otopina risperidona i poznatih onečišćenja za studiju linearnosti

Otopina	Konačna masena koncentracija / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Koncentracijski nivo / %*	Volumen pipetiranja / mL	Odmjerna tikvica / mL
L1	0,5	0,05	1,0	200
L2	0,25	0,25	0,5	200
L3	0,05	0,50	0,1	200

*Koncentracijski nivo izražen s obzirom na masenu koncentraciju risperidona u uzorku za analizu (0,1 mg/mL)

Priređene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3.

3.5.3. Priprema uzoraka za određivanje točnosti

Studija točnosti prevedna je na način da su na aktivnu supstanciju risperidon (masene koncentracije 0,1 mg/mL) cijepljeni standardi svih dostupnih poznatih onečišćenja na tri koncentracijska nivoa (0,05 %, 0,25% i 0,5% koncentracije risperidona). Svaki koncentracijski nivo pripremljen je u triplikatu. Stock otopine onečišćenja priređene su na način da je u tikvicu od 200 mL odvagano oko 2 mg standarda svakog poznatog onečišćenja. Dodan je diluent do polovice volumena i stavljeno na ultrazvučnu kupelj 15 min. Nakon toga tikvica je nadopunjena do oznake. Na opisan način pripremljene se 3 stock otopine. Odvage standarada onečišćenja prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Odvage onečišćenja

Masa / mg	Onečišćenje						
	B	Q	D	E	G	K	Biciklorisperidon
Stock 1	1,384	2,041	1,973	2,272	2,565	2,768	3,165
Stock 2	1,322	2,102	1,954	2,142	2,572	2,843	3,011
Stock 3	1,387	2,234	2,004	2,198	2,457	2,702	2,924

Za pripremu 0,05 % i 0,25 % nivoa stock otopine su dalje razrijeđivane 1,0 mL na 10 mL sa diluentom, dok je za pripremu 0,5 % nivoa korištena ne razrijeđena stock otopina. U 9 tikvica odvagano je oko 2 mg risperidon aktivne supstancije, u koje su prema Tablici 5. dodavane

otopine standarda. Svaki koncentracijski nivo pripremljen je u triplikatu iz 3 zasebno pripremljene stock otopine.

Tablica 5. Priprema otopina za ispitivanje točnosti poznatih onečišćenja risperidona

Otopina	Koncentracijski nivo / %	Volumen pipetiranja / mL	Odmjerna tikvica / mL	Konačna masena koncentracija/ $\mu\text{g/mL}$
T1	0,50	1 mL stock otopine	20	0,50
T2	0,25	5	20	0,25
T3	0,05	1	20	0,05

Priređene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3.

3.5.4. Priprema uzoraka za određivanje granica detekcije i kvantifikacije

Za ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije korištena je otopina radnog standarda risperidona iz studije linearnosti masene koncentracije $0,5 \mu\text{g/mL}$ koja je dalje razrijeđena: 1 mL na 10 mL, 2,5 mL na 10 mL i 5 mL na 10 mL. Priređene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3. te im je određen omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije.

3.5.5. Priprema uzoraka i standarda za određivanje stabilnosti otopine

Za ispitivanje stabilnosti otopine standarda pripremljena je otopina radnog standarda risperidona masene koncentracije $0,2 \mu\text{g/mL}$, te je ostavljena stajati u automatskom uzorkivaču na temperaturi od 20°C . Otopina je analizirana prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3. kroz period od 6 dana.

Za ispitivanje stabilnosti otopine uzorka pripremljena je otopina aktivne supstancije risperidona u radnoj masenoj koncentraciji ($0,1 \text{ mg/mL}$), te je ostavljena stajati u automatskom uzorkivaču na temperaturi od 20°C . Otopina je analizirana prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3. kroz period od 6 dana.

3.5.6. Priprema uzoraka za određivanje preciznosti (ponovljivost)

Uzorak aktivne supstancije risperidona ne sadrži onečišćenja iznad granice kvantifikacije, pa da bi se pripremio reprezentativan uzorak za ispitivanje preciznosti metode u otopinu uzorka (masene koncentracije $0,1 \text{ mg/mL}$) cijepljena su poznata onečišćenja – onečišćenje biciklorisperidon i G, odvage se nalaze u Tablici 6. Paralelno je pripremljeno šest otopina uzorka vaganjem oko 2 mg risperidon aktivne supstancije u tikvicu od 20 mL. Tikvica je nadopunjena otapalom do polovine volumena, te stavljena na ultrazvučnu kupelj 15 minuta.

Nakon toga u svaku tikvicu je pipetrano 2 mL otopine standarda, te je nadopunjena otapalom do oznake. Odvage risperidon aktivne supstancije se nalaze u Tablici 7.

Tablica 6. Priprema otopina onečišćenja za studiju ponovljivosti

Onečišćenje	Masa / mg	Odmjerna tikvica / mL
Biciklorisperidon	1,101	10
G	1,105	10

Tablica 7. Priprema otopina uzorka za studiju ponovljivosti

Priprema uzorka	Masa aktivne supstancije / mg
1	2,616
2	2,342
3	2,305
4	2,289
5	2,207
6	2,450

Priređene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3.

3.5.7. Priprema uzoraka za određivanje preciznosti (intermedijska preciznost)

Intermedijska preciznost je određena na način da su analizirani uzorci pripremljeni na način kao što je opisano u poglavlju 3.5.6. s razlikom da je eksperiment proveden na drugom instrumentu, upotrijebljena je druga kromatografska kolona (drugačiji serijski broj kolone) te su ponovo pripremljene mobilne faze.

3.5.8. Priprema uzoraka za studiju potaknute razgradnje

Da bi se odredili uvjeti optimalne razgradnje risperidona (od 5 % do 20 %) ispitan je utjecaj kiseline, lužine i peroksida različitih koncentracija, te njihov utjecaj bez i uz zagrijavanje. Također je ispitan utjecaj svjetla na stabilnost risperidon aktivne supstancije.

Priprema otopina za potpomognutu razgradnju :

- 1) Razrjeđivanjem 30 % H₂O₂ s vodom priređena je 3 % i 10 % otopina.

- 2) Razrjeđivanjem 10 mol/L otopine NaOH s vodom priređena je 5 mol/L, 3 mol/L, 0,1 mol/L i 1 mol/L otopina.
- 3) Razrjeđivanjem 10 mol/L otopine HCl s vodom priređena je 5 mol/L, 3 mol/L, 0,1 mol/L i 1 mol/L otopina.
- 4) Pripremljene su 23 odvage risperidon aktivne supstancije u zasebne tikvice od 20 mL, Tablica 8, te su podvrgnuti različitim uvjetima potpomognute razgradnje.

Tablica 8. Odvage uzoraka i način razgradnje

Masa (mg)	Reagens	Volumen	Temperatura	Vrijeme, h
2,437	0,1 mol/L HCl	1 mL i otapalo do oznake	ST*	24
2,101	0,1 mol/L HCl	1 mL, bez otapala	ST	24
2,232	0,1 mol/L HCl	1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,166	1 mol/L HCl	1 mL, bez otapala	ST	24
2,351	1 mol/L HCL	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,215	1 mol/L HCl	1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,349	3 mol/L HCl	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,172	5 mol/L HCl	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,199	0,1 mol/L NaOH	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,309	0,1 mol/L NaOH	1 mL, bez otapala	ST	24
2,492	1 mol/L NaOH	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,161	1 mol/L NaOH	1 mL, bez otapala	ST	24
2,227	1 mol/L NaOH	0,1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	5
2,368	1 mol/L NaOH	1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	5
2,227	1 mol/L NaOH	0,1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,368	1 mol/L NaOH	1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,153	5 mol/L NaOH	1mL i otapalo do oznake	ST	24
2,209	3 % H ₂ O ₂	1 mL i otapalo do oznake	ST	24
2,160	3 % H ₂ O ₂	1 mL	ST	24
2,320	3 % H ₂ O ₂	1 mL otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,320	3 % H ₂ O ₂	1 mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	5
2,103	10 % H ₂ O ₂	1 mL Otapalo do oznake i	ST	24
2,217	10 % H ₂ O ₂	1 mL	ST	24
2,066	10 % H ₂ O ₂	1mL i otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	5
2,066	10 % H ₂ O ₂	1mL otapalo do 2/3 tikvice	50 °C	24
2,197	/	otapalo do oznake, LC/ICH Opcija 1	ST	/
2,098	/	bez otapala, LC/ICH Opcija 1	ST	/

*ST – sobna temperature

Nakon 48 sati otopine su neutralizirane dodavanjem 1 mL 0,1 mol/L NaOH u tikvice u kojima se već nalazio 0,1 mol/L HCl (do 2/3 tikvice), isto vrijedi za 1 mol/L, 3 mol/L i 5 mol/L otopinu NaOH, te nadopunjene otapalom do oznake na tikvici. Uzorci su podvrgnuti analizi prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3. Uzorci u kojima se nalazio NaOH nisu neutralizirani HCl-om zato jer je došlo do precipitacije.

3.5.9. Ispitivanje robusnosti / računalni program DryLab

Za određivanje robusnosti metode pripremljena je otopina risperidona radnog standarda masene koncentracije 0,1 mg/mL koja je cijepljena svim poznatim onečišćenjima u masenoj koncentraciji 0,1 mg/mL. Takva otopina analizirana je prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3., osim što su izmijenjeni temperatura kolone i vrijeme analize. Opis kromatografskih parametara koji su promijenjeni opisani su u Tablici 9.

Tablica 9. DryLab parametri

Eksperiment	Kromatografski parametri*
1	Temperatura kolone: 30 °C, vrijeme analize: 10 min
2	Temperatura kolone: 30 °C, vrijeme analize: 30 min
3	Temperatura kolone: 60 °C, vrijeme analize: 10 min
4	Temperatura kolone: 60 °C, vrijeme analize: 10 min

*Svi ostali kromatografski parametri opisani su u poglavlju 3.3.

Nakon provedenih analiza dobiveni kromatogramu su integrirani koristeći Empower računalni program, te uneseni u DryLab računalni program gdje su dalje obrađivani.

3.5.10. Priprema uzoraka za određivanje selektivnosti

Za ispitivanje selektivnosti pripremljene su sljedeće otopine:

- 1) Ph Eur "Risperidone for system suitability" koja sadrži risperidon kao glavnu aktivnu komponentu nacijepljenu onečišćenjima A, B, C, D i E.
- 2) Otopina iz studije linearnosti L3 koja sadrži onečišćenja: B, D, E, G, K, Q i biciklorisperidon.

Priprema otopine opisana je u poglavlju 3.5.2. - Priprema uzoraka za određivanje linearnosti. Navedene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u poglavlju 3.3.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Linearnost

Ispitivanje linearnosti provedeno je za risperidon i za sedam dostupnih onečišćenja: B, D, E, G, K, Q i biciklorisperidon. Kao donja granica masene koncentracije ispitivanja linearnosti uzet je limit kvantifikacije opisan u poglavlju 4.3. (0,05 µg/mL, 0,05 % radne masene koncentracije risperidon uzorka). Gornja granica postavljena je na 0,5 % (0,5 µg/mL) prema maksimalnim količinama onečišćenja propisanim u USP monografiji za risperidon aktivnu supstanciju.

Na temelju rezultata (Tablice 10 - 17) provedene studije linearnosti grafički je prikazana ovisnost površine kromatografskog pika o koncentraciji standarda.

Tablica 10. Rezultati studije linearnosti za risperidona

Uzorak	Masena koncentracija / µg/mL	Nivo / %	Površina / AU	Rf*
Risperidon_1	0,05	0,05	1218	23674732
Risperidon_2	0,10	0,10	2351	23302326
Risperidon_3	0,20	0,20	4658	23083972
Risperidon_4	0,40	0,40	9305	23058058
Risperidon_5	0,50	0,50	11929	23648105

*Rf – faktor odgovora (*engl. Response factor*) – omjer površine pika i koncentracije

Tablica 11. Rezultati studije linearnost za onečišćenje Q

Uzorak	Masena koncentracija / µg/mL	Nivo / %	Površina / AU	Rf
Onečišćenje Q_1	0,51	0,05	4503	8824268
Onečišćenje Q_2	0,26	0,25	2274	8912619
Onečišćenje Q_3	0,05	0,5	425	8330348

Tablica 12. Rezultati studije linearnost za onečišćenje B

Uzorak	Masena koncentracija / µg/mL	Nivo / %	Površina /AU	Rf
Onečišćenje B_1	0,27	0,05	12824	47322336
Onečišćenje B_2	0,14	0,25	6588	48617535
Onečišćenje B_3	0,03	0,5	1387	51182583

Tablica 13. Rezultati studije linearnost za onečišćenje E

Uzorak	Masena koncentracija / μg/mL	Nivo / %	Površina / AU	Rf
Onečišćenje E_1	0,49	0,05	12609	25576994
Onečišćenje E_2	0,25	0,25	6529	26488446
Onečišćenje E_3	0,05	0,5	1329	26966166

Tablica 14. Rezultati studije linearnost za onečišćenje biciklorisperidon

Uzorak	Masena koncentracija / μg/mL	Nivo / %	Površina, AU	Rf
Biciklorisperidon_1	0,59	0,05	7060	11940677
Biciklorisperidon_2	0,30	0,25	3410	11536372
Biciklorisperidon_3	0,06	0,5	727	12293734

Tablica 15. Rezultati studije linearnost za onečišćenje D

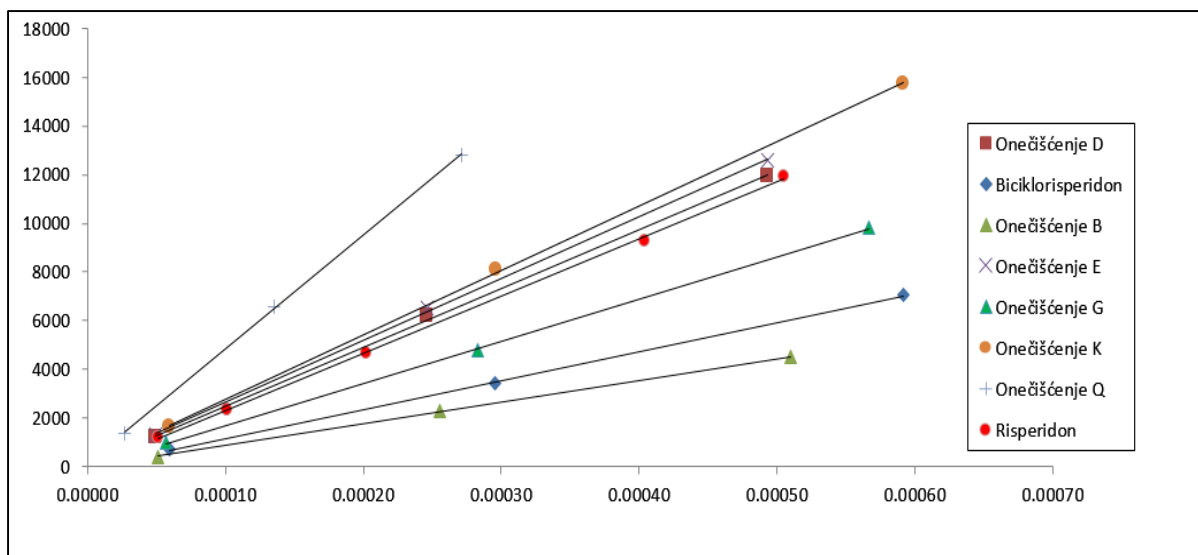
Uzorak	Masena koncentracija / μg/mL	Nivo / %	Površina / AU	Rf
Onečišćenje D_1	0,49	0,05	11935	24196691
Onečišćenje D_2	0,25	0,25	6180	25057512
Onečišćenje D_3	0,05	0,5	1206	24442514

Tablica 16. Rezultati studije linearnost za onečišćenje K

Uzorak	Masena koncentracija / μg/mL	Nivo / %	Površina, AU	Rf
Onečišćenje K_1	0,58	0,05	15743	26593257
Onečišćenje K_2	0,29	0,25	8094	27344905
Onečišćenje K_3	0,06	0,5	1636	27626909

Tablica 17. Rezultati studije linearnost za onečišćenje G

Uzorak	Masena koncentracija / μg/mL	Nivo / %	Površina, AU	Rf
Onečišćenje G_1	0,57	0,05	9805	17315659
Onečišćenje G_2	0,28	0,25	4775	16864208
Onečišćenje G_3	0,06	0,5	982	17350057



Slika 6. Ovisnost površine pika risperidona i onečišćenja o koncentraciji

Tablica 18. Pregled linearnosti onečišćenja i risperidona

Komponenta	Korelacijski faktor	Nagib pravca	Faktor relativnog odgovora	Odsječak, AU
Risperidon	1,000	23482540	NP ^a	-35
Onečišćenje B	1,000	47814200	-0,22	160
Onečišćenje Q	1,000	9054366	2,48	-14
Biciklorisperidon	0,999	11931557	1,35	-26
Onečišćenje D	1,000	24881668	-0,39	91
Onečišćenje K	1,000	26992151	-0,25	139
Onečišćenje E	1,000	25909809	-0,24	146
Onečišćenje G	1,000	17330496	0,76	-46

^a NP- nije primjenjivo

Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da je metoda linearna za risperidon i sva njegova dostupna onečišćenja u području od 0,05 µg/mL do 0,5 µg/mL. Obzirom da je u navedenom rasponu koncentracija komponenti zabilježena linearna ovisnost odaziva detektora o koncentraciji, u svakodnevnoj analizi uzoraka nije potrebno pripremati kalibracijski pravac, već je dovoljna priprema standarda na jednom koncentracijskom nivou. Također je izračunat faktor relativnog odgovora, s obzirom na risperidon. Faktor relativnog odgovora je omjer nagiba pravca svakog onečišćenja i nagiba pravca određenog za risperidon. Ukoliko onečišćenje apsorbira jače od risperidona njegov nagib pravca je veći, pa je faktor

relativnog odgovora veći od 1. Ukoliko komponenta apsorbira slabije od risperidona omjer će biti manji od 1. Onečišćenja B, D, K, E i G apsorbiraju slabije, a onečišćenje biciklorisperidon i Q apsorbiraju jače. Prilikom rutinske analize onečišćenja u aktivnoj supstanciji faktor odgovora standarda risperidona će se za poznata onečišćenja dijeliti sa dobivenim faktorom relativnog odgovora.

4.2. Točnost

Studija točnosti provedena je cjepljivanjem 7 poznatih onečišćenja: onečišćenje biciklorisperidon, Q, B, K, D, G i E na aktivnu supstanciju risperidon na 3 koncentracijska nivoa: 0,05 %, 0,25% i 0,5 %. Otopine za ispitivanje točnosti pripremljene su u triplikatu za svaki koncentracijski nivo. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 19 - 25.

Tablica 19. Izračun studije točnosti za onečišćenje biciklorisperidon

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,08	0,08	0,09	112	114
U1_2	0,08	0,08	0,09	118	
U1_3	0,07	0,07	0,08	111	
U2_1	0,40	0,40	0,4	101	105
U2_2	0,38	0,38	0,40	105	
U2_3	0,37	0,37	0,30	18	
U3_1	0,79	0,79	0,79	100	104
U3_2	0,75	0,75	0,79	104	
U3_3	0,73	0,73	0,78	107	

Tablica 20. Izračun studije točnosti za onečišćenje D

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje> (%)
U1_1	0,05	0,05	0,05	107	106
U1_2	0,05	0,05	0,05	109	
U1_3	0,05	0,05	0,05	102	
U2_1	0,25	0,25	0,25	103	103
U2_2	0,24	0,24	0,25	104	
U2_3	0,25	0,25	0,25	102	
U3_1	0,49	0,49	0,51	104	104
U3_2	0,49	0,49	0,51	105	
U3_3	0,50	0,50	0,51	102	

Tablica 21. Izračun studije točnosti za onečišćenje B

Uzorak	Dodana konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,05	0,05	0,05	99	102
U1_2	0,05	0,05	0,05	103	
U1_3	0,05	0,05	0,06	103	
U2_1	0,25	0,25	0,25	100	98
U2_2	0,26	0,26	0,25	99	
U2_3	0,27	0,27	0,26	94	
U3_1	0,50	0,50	0,50	101	98
U3_2	0,51	0,51	0,50	98	
U3_3	0,55	0,55	0,52	94	

Tablica 22. Izračun studije točnosti za onečišćenje E

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,06	0,06	0,06	114	113
U1_2	0,05	0,05	0,06	107	
U1_3	0,05	0,05	0,06	119	
U2_1	0,28	0,28	0,30	106	109
U2_2	0,26	0,26	0,29	111	
U2_3	0,27	0,27	0,30	110	
U3_1	0,56	0,56	0,58	105	108
U3_2	0,52	0,52	0,58	111	
U3_3	0,54	0,54	0,58	108	

Tablica 23. Izračun studije točnosti za onečišćenje G

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,06	0,06	0,07	116	118
U1_2	0,06	0,06	0,08	119	
U1_3	0,06	0,06	0,07	120	
U2_1	0,32	0,32	0,32	99	99
U2_2	0,32	0,32	0,32	98	
U2_3	0,31	0,31	0,31	101	
U3_1	0,64	0,64	0,60	94	95
U3_2	0,64	0,64	0,61	94	
U3_3	0,61	0,61	0,60	98	

Tablica 24. Izračun studije točnosti za onečišćenje K

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,07	0.07	0,08	117	117
U1_2	0,07	0.07	0,08	117	
U1_3	0,07	0.07	0,08	116	
U2_1	0,34	0.34	0,37	108	109
U2_2	0,35	0.35	0,37	106	
U2_3	0,33	0.33	0,37	112	
U3_1	0,68	0.68	0,73	108	108
U3_2	0,70	0.70	0,73	105	
U3_3	0,66	0.66	0,73	111	

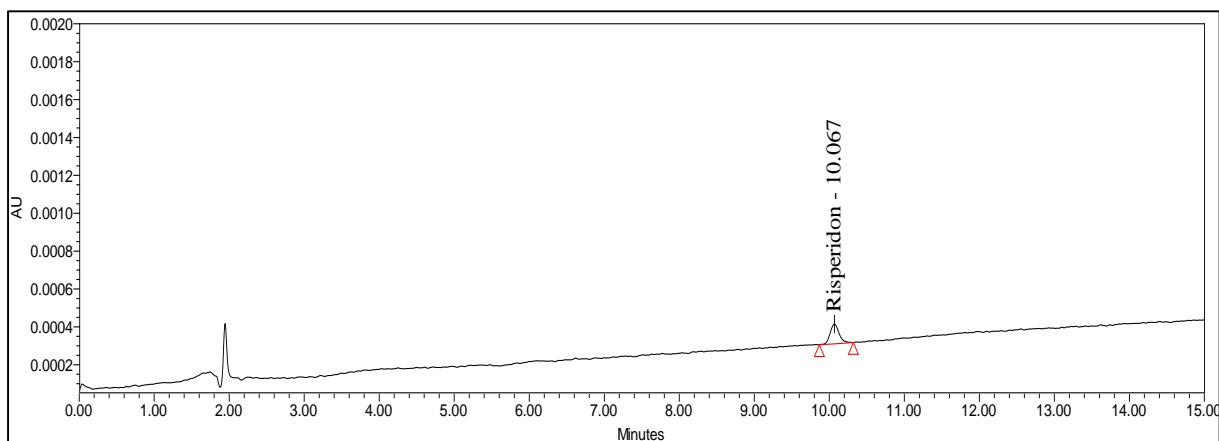
Tablica 25. Izračun studije točnosti za onečišćenje Q

Uzorak	Dodana masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Nivo / %	Dobivena masena konc. / $\mu\text{g/mL}$	Iskorištenje / %	<Iskorištenje>
U1_1	0,03	0.03	0,04	113	110
U1_2	0,03	0.03	0,04	113	
U1_3	0,03	0.03	0,04	104	
U2_1	0,17	0.17	0,16	92	93
U2_2	0,16	0.16	0,16	97	
U2_3	0,17	0.17	0,16	92	
U3_1	0,34	0.34	0,30	89	93
U3_2	0,32	0.32	0,32	98	
U3_3	0,34	0.34	0,31	92	

Točnost metode je određena na temelju pripreme otopina na tri koncentracijska nivoa 0,05 %, 0,25 % i 0,5 %. Dobiveni rezultati su uspoređeni s poznatom dodanom koncentracijom te su prikazani u postotku iskorištenja. Iskorištenje u rasponu od 93 % do 118 % upućuje na to da se metoda može koristiti za rutinske analize onečišćenja u risperidon aktivnoj supstanciji. Ukoliko se metoda želi koristiti za određivanje onečišćenja u nekom drugom matriksu, na primjer tabletama, otopini, injekcijama ili slično, studija točnosti mora se ponoviti sa odgovarajućim placebo. Kroz provedenu studiju točnosti potvrđeno je da matrica risperidon aktivne supstancije ne interferira sa poznatim onečišćenjima, te ne utječe na njihovo kvantitativno određivanje.

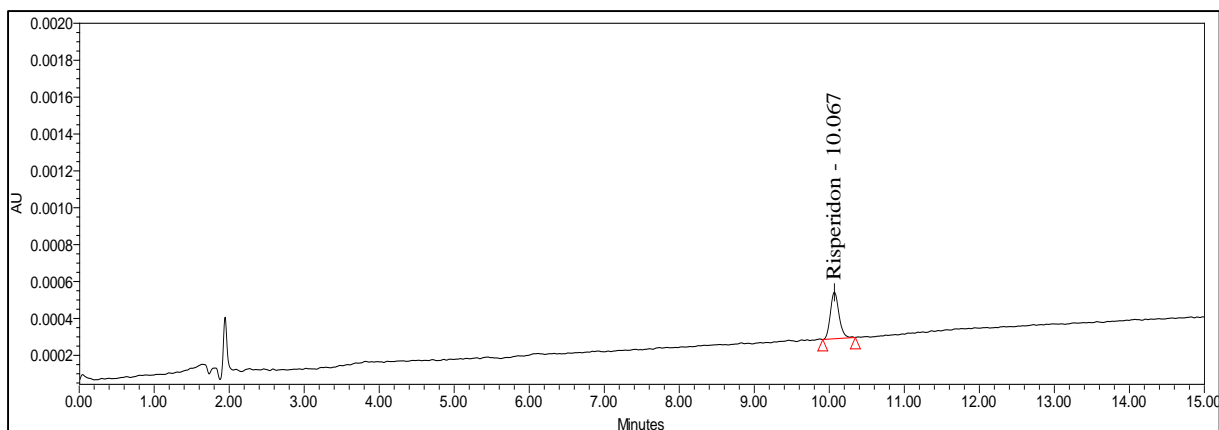
4.3. Osjetljivost – granica detekcije i granica kvantifikacije

Da bi se ispitala koja je najniža koncentracija analita koja se može detektirati i kvantificirati, analiziran je niz otopina risperidona standarda vrlo niskih koncentracija. Otopina masene koncentracije 0,025 µg/mL (0,025 % radne koncentracije uzorka) rezultirala je omjerom šuma i signala kromatografskog pika 6, te je odabrana kao granica detekcije (prikazana na Slici 7.). Sve komponente prisutne u uzorku u postotku manjem od 0,025 % neće biti detektirane ovom metodom.



Slika 7. Kromatogram otopine za određivanje granice detekcije, otopina risperidona masene koncentracije 0,025 µg/mL (0,025 % radne koncentracije uzorka)

Nadalje, otopine masene koncentracije 0,05 µg/mL (0,05 % radne koncentracije uzorka) rezultirala je omjerom šuma i signala kromatografskog pika 15, te je odabrana kao granica kvantifikacije (prikazana na Slici 8.). Sve komponente prisutne u uzorku u postotku većem od 0,05 % mogu se kvantitativno odrediti koristeći opisanu metodu. Granica kvantifikacije dodatno je potvrđena validacijom točnosti i linearnosti opisanim u prethodnim poglavljima.



Slika 8. Kromatogram otopine za određivanje granice kvantifikacije, otopina risperidona masene koncentracije 0,05 µg/mL (0,05 % radne koncentracije uzorka)

4.4. Stabilnost standarda i uzorka

Analiza otopine standarda i otopine uzorka koji su stajali u automatskom uzorkivaču na 20 °C kroz 6 dana, je pokazala da su standard i uzorak stabilni. Nijedan pik u kromatogramu nije izostao niti je došlo do degeneracije pikova.

Tablica 26. Rezultati ispitivanja stabilnosti uzorka risperidon aktivne supstancije

Vrijeme	Sadržaj onečišćenja u uzorku
Start	< granice kvantifikacije
1. dan	< granice kvantifikacije
6. dan	< granice kvantifikacije

Tablica 27. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine standarda risperidona

Vrijeme	Iskorištenje / %
Start	100,0
1. dan	97,6
6.dan	99,7

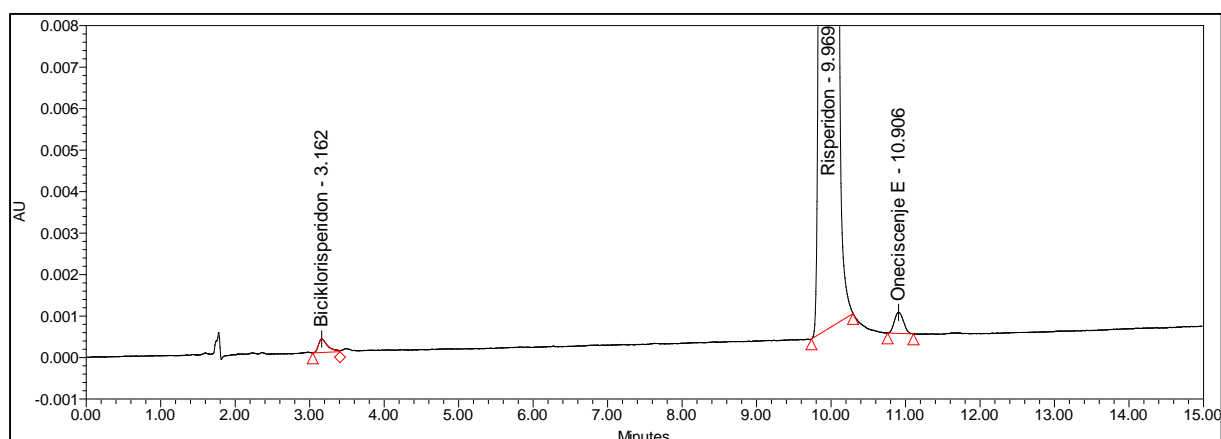
4.5. Preciznost (ponovljivost i intermedijaska preciznost)

Da bi se ispitala ponovljivost metode i pripreme uzorak risperidon aktivne supstancije cijepljen je poznatim onečišćenjima – biciklorisperidonom i onečišćenjem E na nivou 0,1%. U svrhu studije ponovljivosti analizirano je šest priprava cijepljenog Risperidon uzorka, dok

je za ispitivanje intermedijske preciznosti ponovljena analiza na 6 uzoraka koristeći drugi instrument, mobilnu fazu i kolonu. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 28, a reprezentativni kromatogram otopine risperidon aktivne supstancije na Slici 9.

Tablica 28. Rezultati studije ponovljivosti i intermedijske preciznosti

Uzorak	Onečišćenje E / %	Biciklorisperidon / %
Ponovljivost_1	0,11	0,13
Ponovljivost_2	0,12	0,14
Ponovljivost_3	0,11	0,13
Ponovljivost_4	0,11	0,13
Ponovljivost_5	0,11	0,14
Ponovljivost_6	0,10	0,13
<Onečišćenje / % >	0,11	0,13
RSD / %	4	3
Intermedijska_1	0,10	0,11
Intermedijska_2	0,10	0,13
Intermedijska_3	0,10	0,11
Intermedijska_4	0,10	0,12
Intermedijska_5	0,10	0,13
Intermedijska_6	0,10	0,11
<Onečišćenje / % >	0,10	0,11
RSD / %	4	8
Apsolutna razlika / %	0,01	0,02



Slika 9. Kromatogram cijepljene otopine Risperidon aktivne supstancije za ispitivanje preciznosti metode

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da je priprema uzoraka ponovljiva, te da provođenje analize na drugom instrumentu, drugom serijskom broju kolone i korištenjem novo pripremljenih mobilnih faza, ne utječe značajno na dobivene rezultate. Potvrđeno je da su priprema uzorka i metode analize precizni.

4.6. Specifičnost / potaknuta razgradnja

Da bi se odredili optimalni uvjeti potpomognute razgradnje otopina uzorka risperidona podvrgnuta je utjecaju kiseline, lužine i vodikovom peroksidu, različitih jačina (Tablice 29-32) uz različita vremena zagrijavanja. Prema dobivenim rezultatima optimalna razgradnja postignuta je pri sljedećim uvjetima: dodatak 20 mL otapala i 1 mL 3 % H_2O_2 24h na sobnoj temperaturi (Slika 10), 1 mL 0.1 mol/L HCl 48h na sobnoj temperaturi (Slika 11), te 1mL 1 mol/L NaOH na 50 °C 5h (Slika 12). Može se zaključiti da je pik glavne komponente pod svim uvjetima potaknute razgradnje odvojen od pikova onečišćenja.

Najizraženija razgradnja postignuta je u oksidirajućim uvjetima, dodatkom 3 % i 10 % H_2O_2 , pri sobnoj temperaturi i zagrijavanjem na 50 °C gdje sadržaj onečišćenja raste od 18,50 % pa sve do 73,33 %. Onečišćenja Q, Biciklorisperidon i nepoznato onečišćenje na $\text{RRT}=0,19$ su najizraženija degradacijska onečišćenja oksidativnog stresa.

Pri lužnatim uvjetima nije zabilježen značajan raspad risperidona i može se zaključiti da u lužnatom mediju ne dolazi do hidrolize risperidona. Raspad od 1,13 % zabilježen je pri dodatku 1 mol/L NaOH i zagrijavanjem na 50 °C, gdje predominantno raste onečišćenje na $\text{RRT}=0,19$ (koje se također javlja pri oksidativnom stresu). Prema relativnom retencijskom vremenu može se zaključiti da se onečišćenje koje nastaje ne zadržava dugo na kromatografskoj koloni, odnosno da je polarnije od risperidona. Da bi se odredila struktura nepoznatog razgradnog produkta, potrebno je provesti daljnju kromatografsku analizu vezanim sustavom tekućinska kromatografija - spektrometrija masa.

Najizraženija degradacijska onečišćenja koja nastaju pri kiselim uvjetima su onečišćenja biciklorisperidon, B, K, D, G i E. Najveći porast onečišćenja zabilježen je dodatkom 0,1 mol/L HCL nakon 24 sata na sobnoj temperaturi. Ono što je zanimljivo je da je dodatkom jače kiseline – 1 mol/L nakon 24 sata zabilježen manji porast onečišćenja nego kod dodatka 0,1 mol/L kisline. Pretpostavlja se da u kiselom mediju tijekom duljeg vremena

dolazi do sekundarne degradacije, odnosno do raspada onečišćenja, te zato agresivniji uvjeti rezultiraju nižim sadržajem razgradnih produkata.

Tablica 29. Rezultati potaknute razgradnja risperidona u oksidirajućem mediju

H₂O₂								
Konc. / %	10	3	3	3	3	10	10	10
Otapalo / mL	20	20	-	20	20	20	-	20
Vrijeme / h	5	24	24	5	24	24	24	5
Temperatura	50 °C	sobna	sobna	50 °C	50 °C	sobna	sobna	50 °C
Onečišćenje / %								
<i>On.biciklor.</i>	24,86	ND	<LOQ	13,91	ND	21,97	36,52	ND
RRT=0,19	23,45	8,04	8,81	9,23	8,28	26,19	30,13	23,45
RRT=0,22	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	ND	ND
RRT=0,23	ND	0,06	0,10	ND	ND	ND	ND	ND
RRT=0,26	ND	ND	0,08	ND	ND	ND	0,15	ND
RRT=0,31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,07	ND
RRT=0,36	ND	8,84	ND	ND	ND	ND	ND	24,86
RRT=0,46	ND	1,5	4,70	ND	ND	ND	ND	4,82
<i>On Q</i>	4,82	<LOQ	24,82	2,70	33,99	3,69	6,46	ND
<i>On B</i>	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	ND
<i>On. K</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND
<i>On. D</i>	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	ND
<i>On. G</i>	<LOQ	0,06	ND	0,07	7,02	<LOQ	ND	ND
Ukupno	53,12	18,50	38,56	25,90	49,29	51,85	73,33	53,12

Optimalna razgradnja postignuta je djelovanjem 3 % H₂O₂ na uzorak tijekom 24 h. Razgradilo se 18,5 % uzorka. Svi ostali ispitani uvjeti rezultirali su prevelikom razgradnjom risperidona. Od poznatih onečišćenja zabilježen je porast Biciklorisperidona, onečišćenja Q i G (u manjem opsegu). Može se zaključiti da risperidon pri oksidativnim uvjetima nije stabilan.

Tablica 30. Rezultati potaknute razgradnje risperidona u kiselom mediju

HCl					
Konc. / mol/L	1	1	1	0,1	0,1
Otapalo / mL	-	20	20	20	-
Vrijeme / h	24	24	24	24	24
Temperatura	sobna	sobna	50 °C	50 °C	Sobna
Neutralizacija, 48 h	da	da	da	da	da
Onečišćenje / %					
On.biciklor.	0,06	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ
RRT=0,18	0,07	0,73	0,14	ND	0,06
RRT=0,19	0,10	ND	0,16	0,05	ND
RRT=0,20	0,10	ND	0,12	ND	ND
RRT=0,21	0,12	ND	0,09	ND	ND
RRT=0,22	ND	0,09	0,11	ND	ND
RRT=0,23	0,08	0,10	ND	ND	0,05
RRT=0,25	0,11	<LOQ	ND	ND	ND
On Q	<LOQ	<LOQ	0,22	<LOQ	0,11
On B	<LOQ	<LOQ	0,11	<LOQ	0,16
On. K	<LOQ	<LOQ	0,08	<LOQ	0,18
On. D	<LOQ	<LOQ	ND	0,44	1,78
On. G	0,14	<LOQ	ND	0,19	<LOQ
On. E	<LOQ	ND	ND	<LOQ	0,21
Ukupno	0,78	0,92	1,03	0,68	2,55

Rezultati analize potaknute razgradnje pod utjecajem kiseline, pokazali su da je risperidon stabilan u kiselom mediju. Onečišćenja biciklorisperidon, Q, B i K pokazuju jako mali rast, dok ostala poznata onečišćenja ne pokazuju porast prilikom kisele hidrolize. Zamijećen je porast polarnih onečišćenja koja eluiraju sa kolone u kratkom retencijskom vremenu (RRT=0,18 i RRT=0,19), međutim njihova struktura nam nije poznata. Ukupne vrijednosti onečišćenja kreću se od 0,78 % do 2,55 %.

Tablica 31. Rezultati potaknute razgradnje risperidona u lužnatom mediju

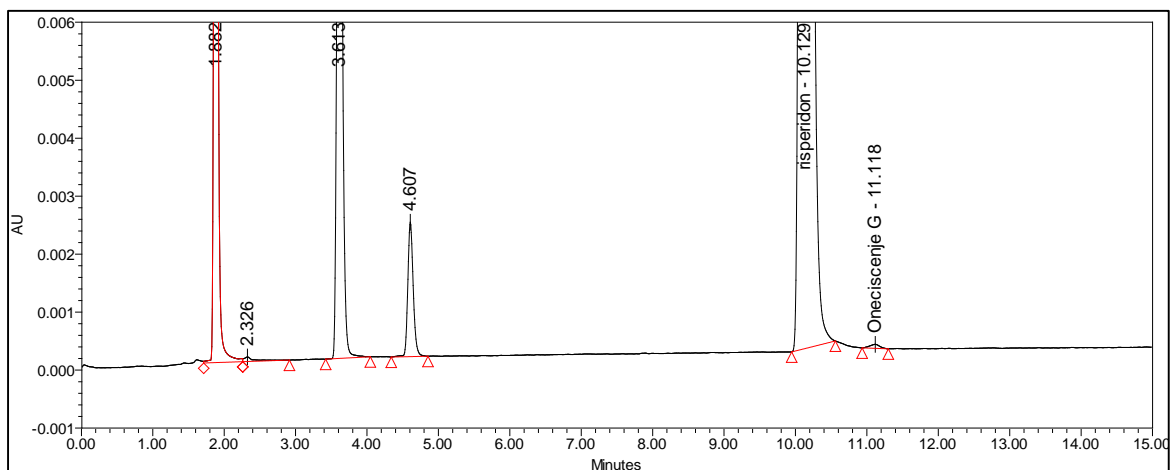
NaOH									
Konc. / mol/L	0,1	0,1	0,1	0,1	1	1	1	1	5
Otapalo / mL	-	20	20	20	-	20	20	20	20
Vrijeme / h	24	24	5	24	24	24	5	24	24
Temperatura	sobna	sobna	50 °C	50 °C	sobna	sobna	50 °C	50 °C	sobna
Onečišćenje / %									
<i>On.biciklor.</i>	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ
RRT=0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND
RRT=0,18	ND	ND	ND	ND	0,14	ND	0,21	0,39	ND
RRT=0,19	ND	ND	ND	ND	ND	0,85	0,85	ND	ND
RRT=0,20	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	0,07	0,19	ND
RRT=0,23	ND	ND	0,05	0,05	0,06	ND	ND	0,18	ND
On. Q	ND	<LOQ	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND
On B	ND	<LOQ	ND	0,21	ND	ND	ND	ND	ND
On. D	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	0,09	0,06
<i>On. G</i>	ND	0,14	<LOQ	0,07	0,06	ND	ND	0,05	ND
<i>On. E</i>	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RRT=1,08	ND	ND	ND	ND	0,12	ND	ND	ND	0,52
RRT=1,09	0,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ukupno	0,14	0,14	0,05	0,33	0,38	0,91	1,13	0,96	0,58

Rezultati analize potaknute razgradnje pod utjecajem lužine, pokazali su da risperidon nije osjetljiv na hidrolizu u lužnatom mediju. Onečišćenja B, D i G pokazuju mali porast, dok se onečišćenja biciklorisperidon i Q nalaze ispod LOQ-a ili nisu mogli biti detektirani. Ukupne vrijednosti onečišćenja kreću se od 0,05 % do 1,13 %. Također je kao i kod hidrolize u oksidirajućim uvjetima zamijećen porast polarnih onečišćenja na relativnim retencijskim vremenima 0,18 i 0,19.

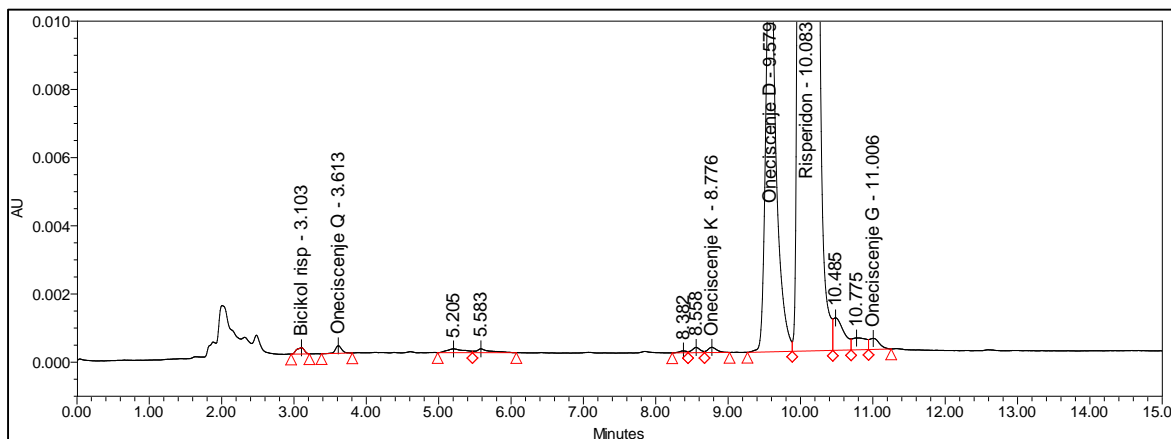
Tablica 32. Rezultati razgradnje risperidona pod utjecajem svjetla (LC/ICH Opcija 1)

svjetlo		
Otapalo / mL	20	-
Temperatura	sobna	sobna
Onečišćenje / %		
On.biciklor.	<LOQ	ND
On. Q	<LOQ	<LOQ
On B	<LOQ	ND
On. G	<LOQ	ND
On. E	ND	ND
RRT=1,10	0,08	0,08
Total	0,08	0,08

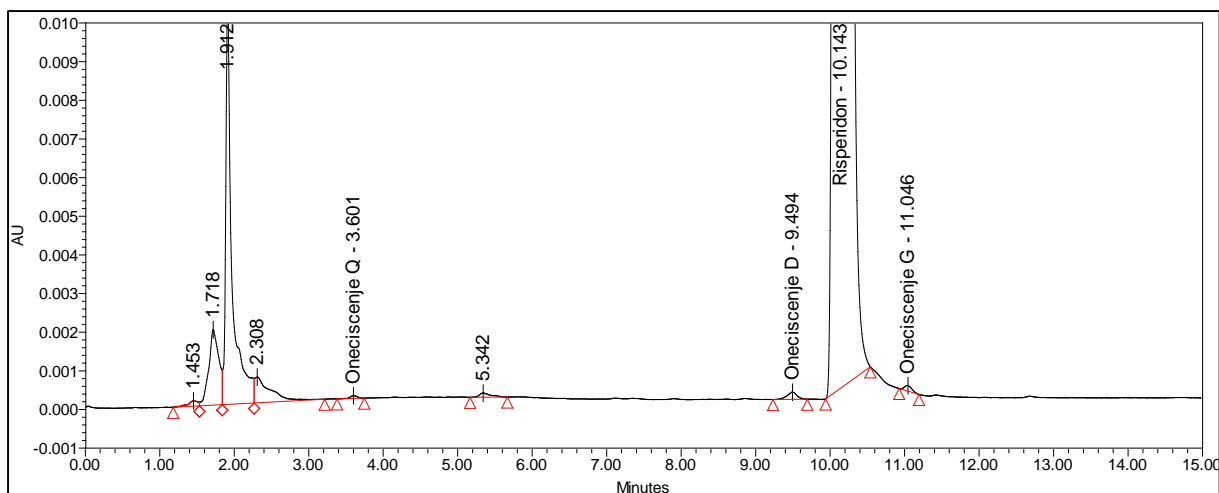
Potaknuta razgradnja pod utjecajem svjetla nije rezultirala porastom onečišćenja (Slika 13). Vrijednosti su ispod LOQ-a ili nisu detektirana, stoga se može zaključiti da je risperidon stabilan pod utjecajem svjetla.



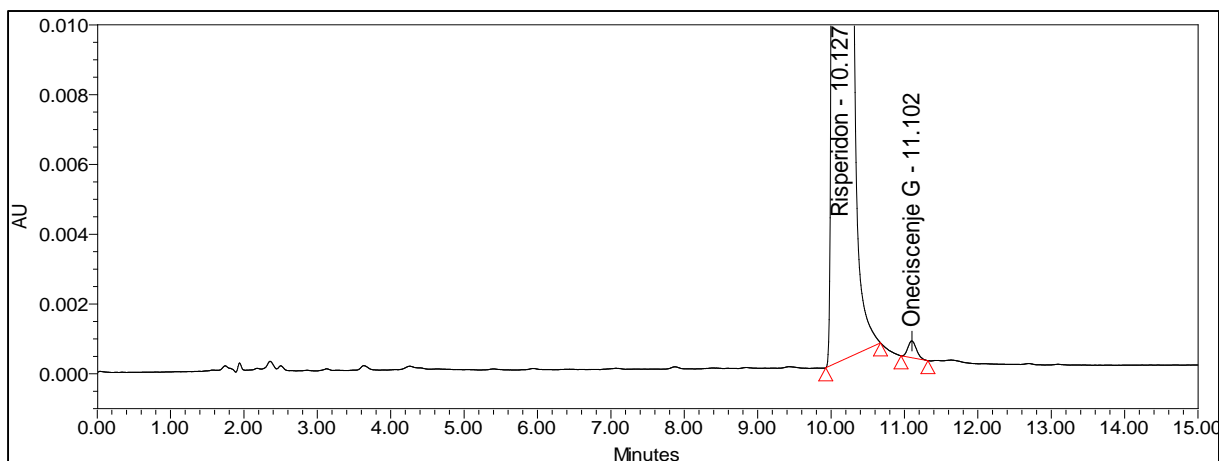
Slika 10. Uzorak risperidona razgrađen 3 % otopinom H₂O₂ tijekom 24 h



Slika 11. Uzorak risperidona razgrađen 0,1 mol/L otopinom HCl tijekom 24 h na 50 °C



Slika 12. Uzorak risperidona razgrađen 1 mol/L otopinom NaOH na 50 °C tijekom 5 h



Slika 13. Uzorak risperidona izložen utjecaju svjetla - LC/ICH Opcija 1

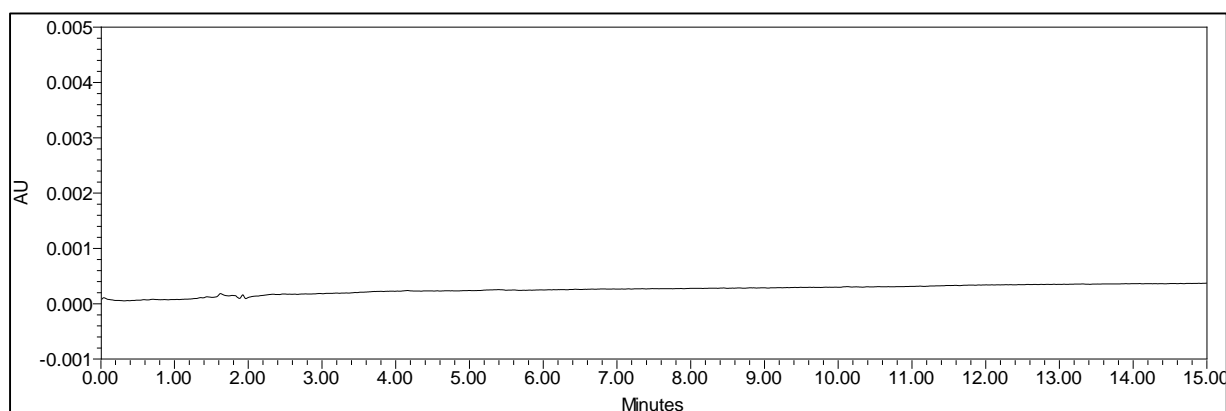
4.7. Područje rada metode

Na temelju podataka linearnosti i točnosti metode, područje rada metode potvrđeno je u koncentracijskom rasponu od 0,05 µg/mL do 0,5 µg/mL (0,05 % do 0,5 % radne koncentracije risperidona).

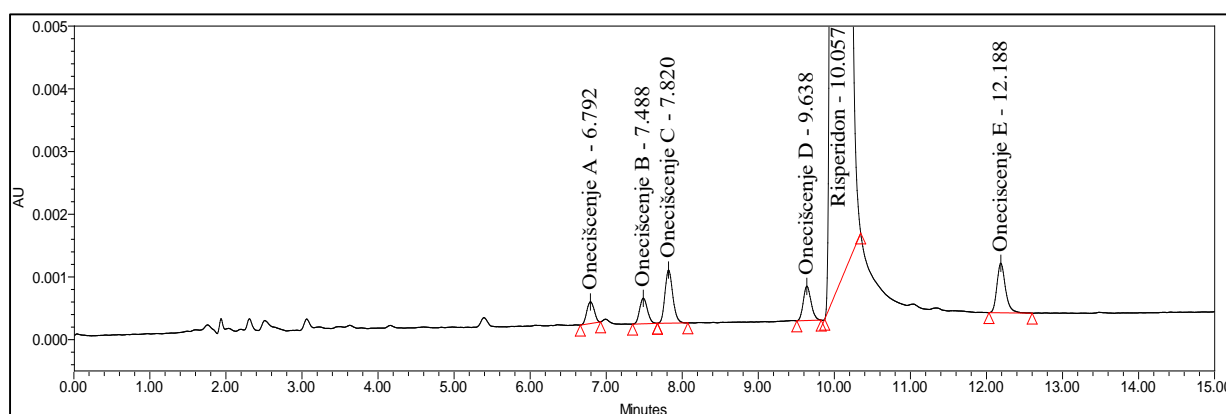
4.8. Selektivnost

Pripremljene su otopine *Ph Eur "Risperidone for system suitability"* (kao što je opisano u potpoglavlju 3.5.9.) koja sadrži risperidon kao glavnu aktivnu komponentu cijepljenu

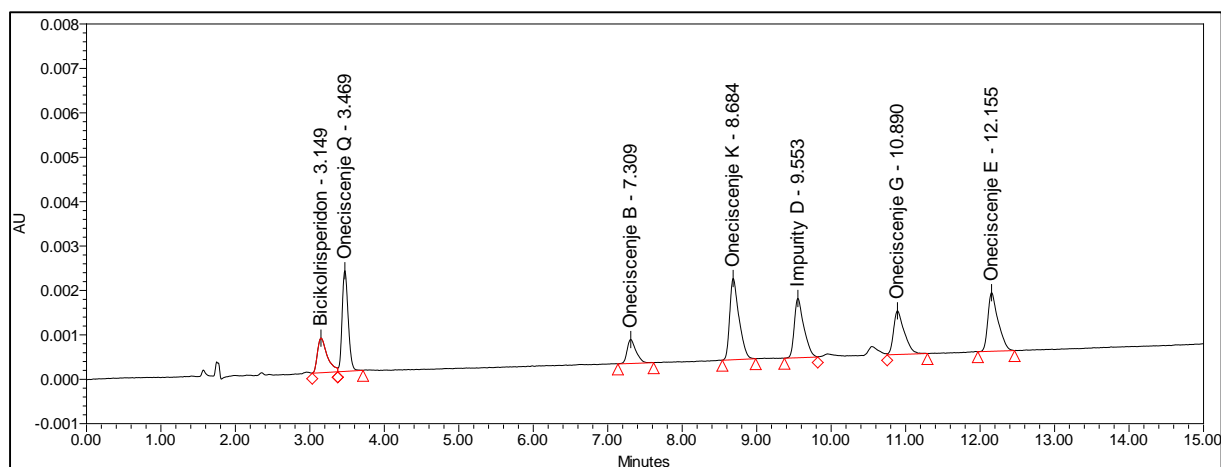
onečišćenjima A, B, C, D i E, te je pripremljena otopina L3 koja sadrži onečišćenja: B, D, E, G, K, Q i biciklorisperidon. Iz dobivenih kromatograma prikazanih na Slikama 15 i 16, određena su retencijska vremena i relativna retencijska vremena te prikazana u Tablici 33.



Slika 14. Kromatogram otapala



Slika 15. Kromatogram otopine *Ph Eur " Risperidone for system suitability"*



Slika 16. Kromatogram otopine L3

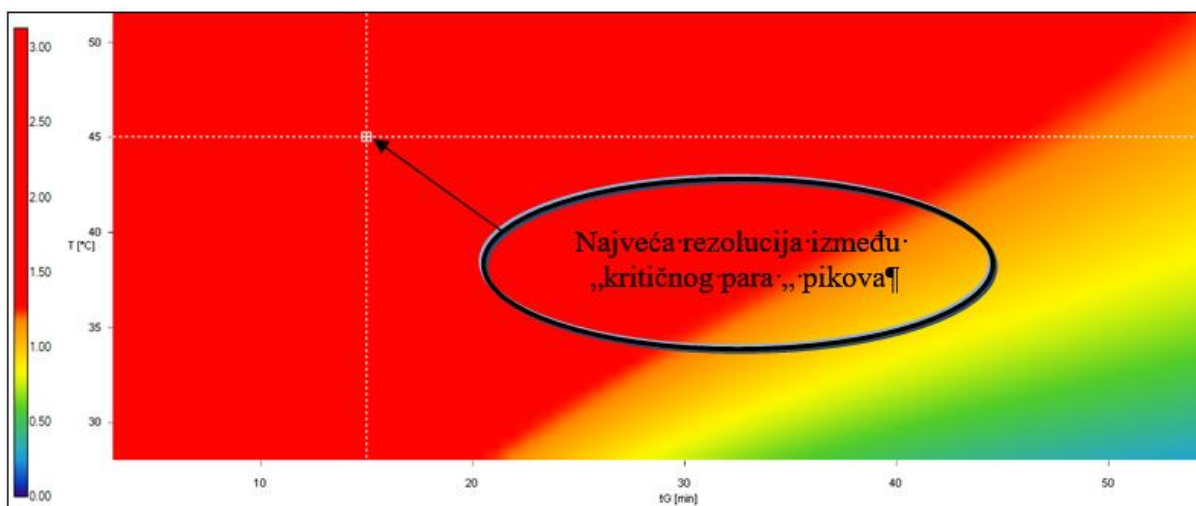
Tablica 33. Retencijsko vrijeme risperidona i njegovih poznatih onečišćenja

	KOMPONENTA	RT	RRT
1	Biciklorisperidon	3,226	0,32
2	Onečišćenje Q	3,623	0,36
3	Onečišćenje A	6,792	0,68
4	Onečišćenje B	7,488	0,74
5	Onečišćenje C	7,820	0,78
6	Onečišćenje K	8,556	0,85
7	Onečišćenje D	9,638	0,96
8	RISPERIDON	10,058	1,00
9	Onečišćenje G	10,890	1,08
10	Onečišćenje E	12,188	1,21

Iz kromatograma je vidljivo da su sva ispitivana onečišćenja odvojena jedna od drugih kao i od pika risperidona, te je time potvrđena selektivnost metode. Onečišćenje biciklorisperidon, te onečišćenja Q, A, C, B, K i D imaju kraća retencijska vremena od risperidona što je rezultat veće polarosti od risperidona. Oni osim karbonilne skupine i atoma dušika u cikličkoj strukturi, imaju i polarnu hidroksilnu skupinu te atom fluora. Za razliku od njih, onečišćenja E i G eluiraju kasnije jer su nepolarniji zbog metilne skupine i R bočnog ogranka. Red elucije analita s kolone je u skladu sa kromatografijom obrnutih faza koja je korištena. Metoda je selektivna za određivanje risperidona i njegovih onečišćenja.

4.9. Robusnost

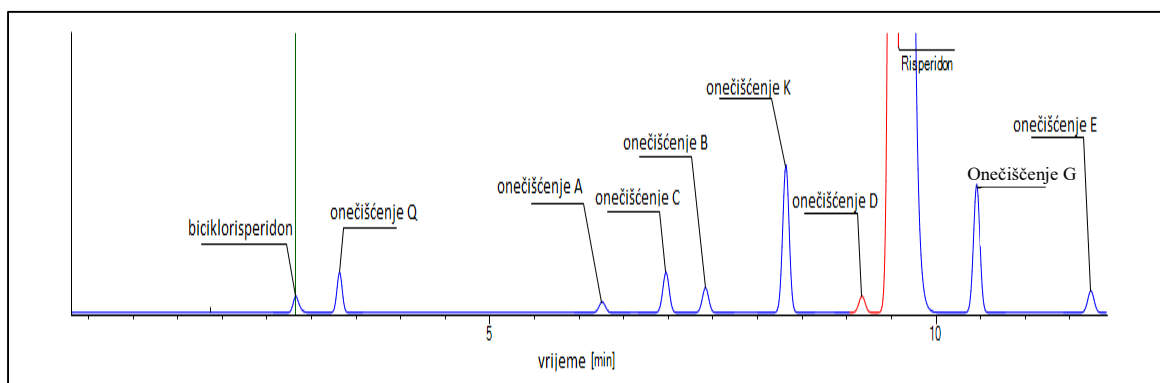
Ispitivanje robusnosti metode provedena je pomoću računalnog programa DryLab. Bazirano na kromatogramima 4 analize (uvjeti provođenja analize opisani u poglavlju 3.5.10.), računalni program DryLab izračunao je "Mapu robusnosti" prikazanu na Slici 17.



Slika 17. Mapa robusnosti za TgT model kromatografske metode za određivanje razgradnih produkata risperidona

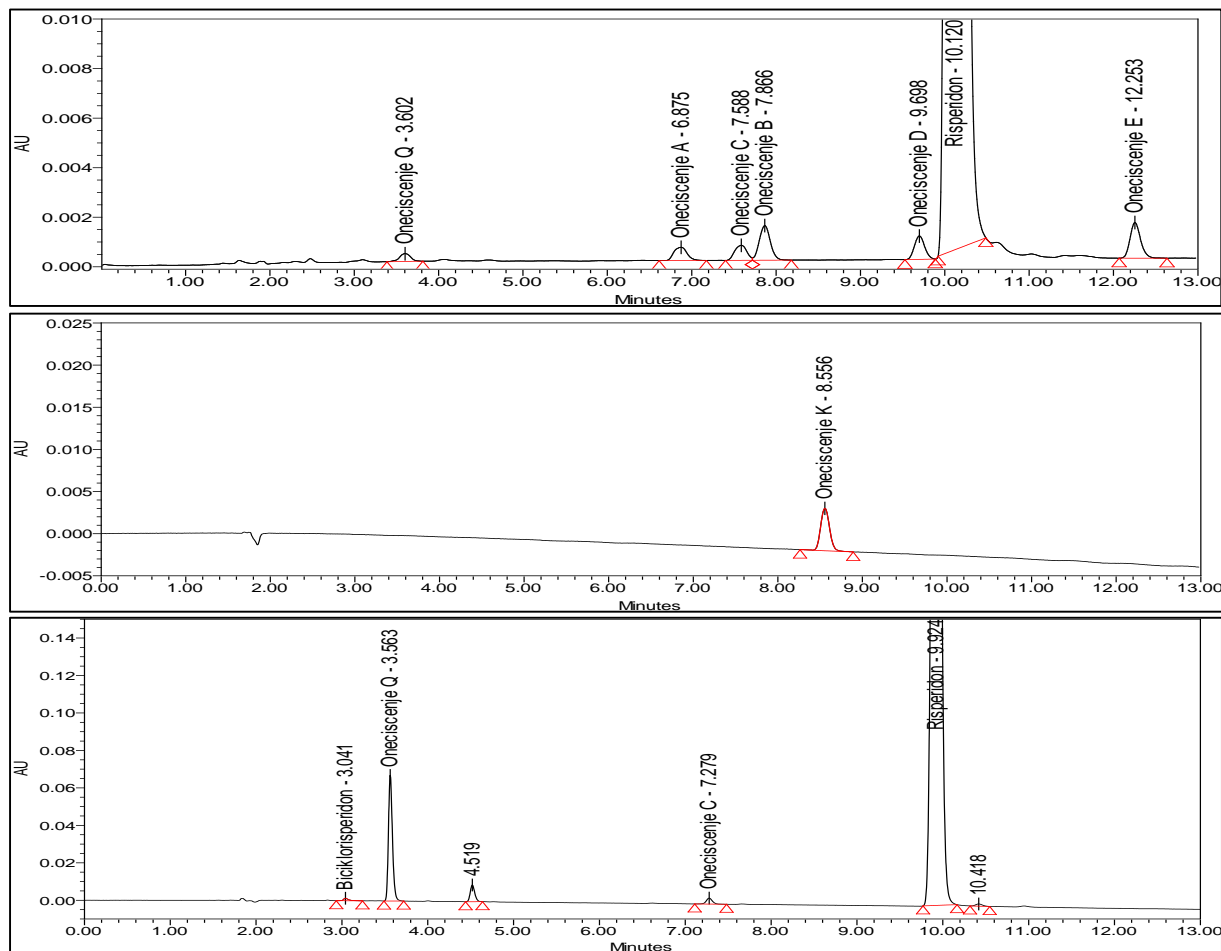
Mapa robusnosti opisuje rezoluciju između dva najbliža pika u kromatogramu u ovisnosti o promjeni temperature kolone (T [°C]) i o promjeni vremena gradijentnog eluiranja (tG). Prema legendi uz sliku područje označeno crvenom bojom označava kromatografske uvijete (temperature kolone i vrijeme eluiranja) koji rezultiraju rezolucijom između najbližih pikova (“kritičnog para” pikova) većom od 1,5 (razdvajanje do bazne linije). Također je označeno mjesto na rezolucijskoj mapi koje rezultira najvećom rezolucijom. Predikcija kromatograma pri takvim uvjetima analize prikaza je na Slici 18.

Označeno mjesto sa najvećom rezolucijom odgovara točnim parametrima metode opisanim u poglavlju 3.3. Vidljivo je da je to mjesto u sredini crvenog područja, odnosno promjenom temperature (± 5 °C), te promjenom vremena analize (± 5 min) pikovi onečišćenja će ostati razdvojeni do bazne linije, odnosno neće doći do koelucije pikova.



Slika 18. Predikcija kromatograma prema metodi DryLab

U sklopu selektivnosti provedena je analiza otopina risperidona (prikazano na Slici 19), te je potvrđeno da je predikcija dobivena DryLab-om ispravna.



Slika 19. Kromatogrami dobiveni analizom otopina risperidona naciyepljenih poznatim onečišćenjima analizirani prema uvjetima najveće rezolucije iz DryLab-a

Izračun robusnosti proveden je u DryLab-u uvođenjem namjernih varijacija od validiranih kromatografskih uvjeta, prikazanih u Tablici 9 i na Slici 20.

The screenshot shows the DryLab software interface. At the top, it displays 'Required Resolution 1.5', 'Successful Experiments: 243', and 'Success Rate [%] 100 %'. Below this, the 'Method Conditions' section includes input fields for 'tG' (15 min), 'T' (45 °C), 'Flow Rate' (0.35 mL/min), 'Start %B' (55 %B), and 'End %B' (70 %B). At the bottom, there are fields for 'No. of Levels (2 or 3)' (3) and 'No. of Factors' (5), along with 'Start Calculations' and 'Get Method Data' buttons.

Slika 20. Varijacije validiranih kromatografskih uvjeta

5. ZAKLJUČAK

Kroz provedene eksperimente potvrđeno je da je metoda određivanja razgradnih produkata risperidona tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti linearna, točna, ponovljiva i robusna. Potvrđene granice kvantifikacije i detekcije odgovaraju osjetljivosti USP i Ep monografske metode, te se time smatraju prikladnim za analizu onečišćenja i razgradnih produkata u risperidon aktivnoj supstanciji.

Određene su detekcijske i kvantifikacijske granice metode, te iznose 0,25 µg/mL i 0,05 µg/mL. Komponente prisutne u uzorku u postotku manjem od 0,025 % neće biti detektirane, a veće od 0,05 % moći će se kvantitativno odrediti. Potvrđena je linearnost metode u području od 0,05 µg/mL do 0,5 µg/mL, kao i selektivnost zato jer je iz kromatograma vidljiva odvojenost svih pikova od glavne komponente. Otopine standarda i uzorka stabilne su 6 dana na temperaturi od 20 °C. Točnost metode prikazana je postotkom iskorištenja koji se kreće u rasponu od 93 % do 118 %. Iz rezultata linearnosti i točnosti potvrđeno je područje rada metode od 0,05 µg/mL do 0,5 µg/mL. Kroz ispitivanje potpomognute razgradnje potvrđene su stabilitetno indikativne karakteristike metode. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je risperidon stabilan u svim uvjetima, osim pod utjecajem peroksida, pri čemu je optimalna razgradnja postignuta sa 3 %-tnom otopinom H₂O₂ te iznosi 18,5 %. Zabilježen je porast biciklorisperidona, onečišćenja Q i G (u manjem opsegu), a svi ostali ispitani uvjeti (temperatura, koncentracija peroksida, vrijeme) pod utjecajem peroksida rezultirali su prevelikom razgradnjom risperidona. Potaknuta razgradnja pri kiselim uvjetima, rezultirala je vrlo malom degradacijom risperidona, te kao posljedica toga nastaje i vrlo malo pikova onečišćenja biciklorisperidon, Q, B i K, a optimalna razgradnja postignuta je jedino djelovanjem s 0,1 mol/L HCl nakon čega je slijedila neutralizacija s NaOH te iznosi 1,13 %. Ukupne vrijednosti onečišćenja kreću se od 0,78 % do 2,55 %. Rezultati analize potaknute razgradnje pod utjecajem lužine, pokazali su da risperidon nije osjetljiv na hidrolizu u lužnatom mediju, te je zabilježen samo mali porast onečišćenja B, D i G. Ukupne vrijednosti onečišćenja kreću se od 0,05 % do 1,13 %. Potaknuta razgradnja pod utjecajem svjetla nije rezultirala porastom onečišćenja, te se može reći da je risperidon stabilan pod utjecajem svjetla.

POPIS KRATICA

AD – adsorpcijska kromatografija (engl. *Adsorption Chromatography*)

BEH čestice – hibridne čestice povezane etilenskim mostom (engl. *Bridged – Ethylene Hybrid Particles*)

CAD – detektor nabijenog aerosola (engl. *Charged Aerosol Detector*)

DA – D₂ receptor - receptor dopamina tipa 2

DMSO – dimetil sulfoksid

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*)

ICH - internacionalne konferencije za harmonizaciju (engl. *International Conference on Harmonisation*)

IEC – kromatografija ionske izmjene (engl. *Ion – Exchange Chromatography*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LOD – granica detekcije (engl. *limit of detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*)

MS detektor – spektrometar masa kao detektor (engl. *Mass – Spectrometry Detector*)

RI detektor – detektor indeksa loma (engl. *Refractive Index Detector*)

RPC – kromatografija obrnutih faza (engl. *Reversed – Phase Chromatography*)

SEC – kromatografija isključenjem (engl. *Size – Exclusion Chromatography*)

TEA - trietilamin

UHPLC - tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra – High Pressure Liquid Chromatography*)

USP – američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*)

UV detektor – detektor ultraljubičastog zračenja (engl. *Ultraviolet Detector*)

6. LITERATURA

- [1] T. Nejedly, P. Pilarova, P. Kastner, Z. Blazkova, J. Klimes, *Development and Validation of Rapid UHPLC Method for Determination of Risperidone and its Impurities in Bulk Powder and Tablets*, IJRPC, **4** (2014) 261–266.
- [2] M. Corena – McLeod, *Comparative Pharmacology of Risperidone and Paliperidone*, Drugs R D, **15** (2015) 163 – 174.
- [3] A. P. Suthar, S. A. Dubey, S. R. Patel, A. M. Shah, *Determination of Risperidone and Forced Degradation Behaviour by HPLC in Tablet Dosage Form*, Int. J. Pharm.Tech. Res., **1** (2009) 568–574.
- [4] J. E. Leysen, W. Gommeren, A. Eens, D. de Chaffoy de Courcelles, J. F. Stoof, P. A. J. Janssen, *Biochemical Profile of Risperidone, a New Antipsychotic*, J. Pharmacol. Exp. Ther., **247** (1988) 661–670.
- [5] <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=9771#section-4.2> (pretraženo: 31.10.2016.)
- [6] EP monografija
- [7] P. Sattanathan, J. Moses Babu, K. Vyas, R. B. Reddy, S. T. Rajan, P. Sudhakar, *Structural Studies of Impurities of Risperidone by Hyphenated Techniques*, J. Pharmaceut. Biomed., **40** (2006) 598–604.
- [8] R. Cools, K. Nakamura, N. D. Daw, *Serotonin and Dopamine: Unifying Affective, Activational and Decision Functions*, Neuropsychopharmacol, **36** (2011) 98–113.
- [9] P. Karlson, (1974.), Biokemija, VIII. izdanje, Školska knjiga, Zagreb
- [10] <http://www.akademai.com/doi/pdf/10.1556/AChrom.22.2010.4.5> (pretraženo: 29.10.2016.)
- [11] Maślanka, A., Krzek, J., Patrzalek, A., *Determination of risperidone in tablets, in the presence of its degradation products and placebo-derived constituents*, Acta Pol. Pharm., **5** (2009) 461–470.

- [12] Tomar, R.S., Joseph, T.J., Murthy, A.S.R., Yadav, D.V., Subbaiah, G., Reddy, K.K., *Identification and characterization of major degradation products of risperidone in bulk drug and pharmaceutical dosage forms*, Pharmaceut. Biochem., **36** (2004) 231–235.
- [13] Darren Svirskis, Jadranka Travas-Sejdic, Sanjay Garg, *A stability-indicating HPLC method for the determination of electrochemically controlled release of risperidone*, J. Chromatogr. Sci., **49** (2011) 780–785.
- [14] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19353731> (pretraženo: 29.10.2016.)
- [15] Dedania, Z. R., Dedania, R. R., Sheth, N. R., Patel, J. B., Patel, B., *Stability indicating HPLC determination of risperidone in bulk drug and pharmaceutical formulation*, Int. J. Anal. Chem., (2011.) 124917–124923.
- [16] USP monografija
- [17] Waters Corporation, *A validated UPLC/MS/MS method for risperidone and 9-hidroxyrisperidone in human plasma*, (2005) Application note
- [18] Chen, C. T., Cheng, C. W., Hu, Y. F., *Development and validation of RP-UPLC method for determination of related substances in risperdal consta*, J. Chromatogr. Sep. Tech., **6** (2015) 1–5.
- [19] C. Bharathi, D. Krishnama Chary, M. Saravana Kumar, R. Shankar, V. K. Handa, R. Dandala, A. Naidu, *Identification, Isolation and Characterization of Potential Degradation Product in Risperidone Tablets*, J. Pharmaceut. Biomed., **46** (2008) 165–169.
- [20] Z. A. El – Sherif, B. El – Zeany, O. M. El – Houssini, *High Performance Liquid Chromatographic and Thin Layer Densitometric Methods for Determination of Risperidone in The Presence of its Degradation Products in Bulk Powder and in Tablets*, J. Pharmaceut. Biomed., **36** (2004) 975–981.
- [21] S. L. Blandia, K. K. Bhatt, R. S. Mehta, D. A. Shah, *RP – HPLC Estimation of Risperidone in Tablet Dosage Forms*, IJPS **70** (2008) 494–497.
- [22] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71744282#section=Names-and-Identifiers> (pretraženo: 7.2.2017.)

- [23] Vascuri Janardhana Rao, Rama Shankar, Khagga Mukkanti, N.A. Vekariya, *Synthesis and Characterization of Impurity G of Risperidone: An Antipsychotic Drug*, J. Chem. Pharm. Res., **5** (2013) 141–145.
- [24] <http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> (pretraženo: 26.9.2015.)
- [25] V. Ravichadran, S. Shalini, K.M. Sundram, Harish Rajak, *Validation of analytical methods - strategies and importance*, Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci, **2** (2010) 18–22.
- [26] <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf> (pretraženo: 26.9.2015.)
- [27] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf (pretraženo: 26.9.2015.)
- [28] <http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=6941> (pretraženo: 24.7.2015.)
- [29] ICH Guidance for Industry, Q2B:Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference of Harmonization
(<http://www.fda.gov/downloads/Regulatoryinformation/Guidances/UCM128049.pdf>)1996.
(pretraženo 23.7.2015.)
- [30] U.J. Krull, M. Thompson, (2001), Analytical chemistry, 3rd edition, Encyclopedia of Physical Science and Technology, Toronto
- [31] D. Harvey, (2000), Modern analytical chemistry, 1st edition, McGraw – Hill, Boston, USA
- [32] F. W, Fifield, D. Kealey, (2000), Principles and practise in analytical chemistry, 5th edition, Blackwell Science, Abingdon, England
- [33] S. R. Mikkelsen, E. Cortón, (2004), Bioanalytical chemistry, John Wiley & Sons, New Jersey, USA
- [34] H.Brummer, (2011), How to Approach a Force Degradation Study, Life Sci. Technol. Bull.**31** 1–4

- [35] ICH Guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference of Harmonization (<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidance/ucm128204.pdf>) (pretraženo: 28.7.2015.)
- [36] M. Hasija, L. Li, N. Rahman, S. F. Ausar, *Forced Degradation Studies: an Essential Tool for the Formulation Development of Vaccines*, *Vaccine: Development and Therapy*, Dove Medical Press, **3** (2013) 11–33.
- [37] http://www.particlesciences.com/docs/Forced_Degradation_Studies-DDT_June2010-rd3.pdf (pretraženo: 27.9.2015.)
- [38] <http://www.slideshare.net/Analysys/apat-2013-gc-workshop-2> (pretraženo: 30.10.2016.)
- [39] C. F. Poole, S. K. Poole, (1991.), *Chromatography today*, Elsevier, Netherlands
- [40] M. W. Dong, K. Zhang, *Ultra – High Pressure liquid Chromatography in Method Development*, *Trend. Anal. Chem.*, **63** (2014) 21–30.
- [41] J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson, *Ultrahigh – Pressure Reversed – Phase Capillary Liquid Chromatography: Isocratic and Gradient Elution Using Columns Packed with 1,0 - μ m Particles*, *Anal. Chem.*, **71** (1999) 700–708.
- [42] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19032340> (pretraženo: 6.8.2015.)
- [43] A. H. Schmidt, I. Molnár, *Using an Innovative Quality – by - Design Approach for Development of a Stability Indicating UHPLC Method for Ebastine in the API and Pharmaceutical Formulations*, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **78–79** (2013.) 64–74.
- [44] http://www.waters.com/waters/en_HR/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_HR (pretraženo: 6.8.2015.)
- [45] L. Nováková, I. Kaufmannová, R. Jánská, *Evaluation of Hybrid Hydrophilic Interaction Chromatography Stationary PHASES For Ultra HPLC in Anlysis of Polar Pteridines*, *J. Sep. Sci.*, **33** (2010) 765–772.
- [46] C. T. Mant, R. S. Hodges, (1991.), *High – Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, CRC Press, Inc.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. listopada 1991. godine u Nürtingenu u Njemačkoj. Nakon završene osnovne škole Ivana Mažuranića u Vinkovcima, 2006. godine upisujem gimnaziju M. A. Reljković u Vinkovcima. Potom, 2010. godine upisujem Sveučilišni preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku gdje 2013. godine stječem akademsko zvanje prvostupnice kemije. Završetkom preddiplomskog studija, 2013. godine upisujem Sveučilišni diplomski studij kemije, smjer analitička kemija i biokemija na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.